

Aus dem Bereich theoretische Medizin und Biowissenschaften  
Fachbereich zelluläre Neurophysiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# Untersuchung zur Freisetzbarkeit elektronendichter Granula aus murinen Neuronen der Spinalganglien und zu ihrer Beeinflussung durch Neuropeptid Y

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades

**- Dr. rer. nat. -**

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2014

vorgelegt von Anneka Bost

geboren am 28.09.1983 in Saarlouis

- Homburg 2014 -

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Summary.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Neurone der Spinalganglien (DRG-Neurone) .....	1
1.2. LDCVs in DRG-Neuronen .....	3
1.3. Exozytose von Vesikeln .....	5
1.4. Neuropeptid Tyrosin (NPY).....	6
1.5. Fragestellung der Arbeit.....	7
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>9</b>
2.1. Material .....	9
2.1.1. Chemikalien .....	9
2.1.2. Enzyme.....	11
2.1.3. Lösungen.....	11
2.1.4. Antikörper.....	16
2.1.5. Primer .....	16
2.1.6. Bakterienstamm .....	16
2.1.7. Viren .....	16
2.1.8. Mauslinien .....	17
2.1.9. Zelllinie.....	17
2.1.10. Kits .....	17
2.1.11. Geräte .....	17
2.1.12. Setup und Zubehör .....	18
2.1.13. Verbrauchsmaterialien .....	18
2.1.14. Software .....	19
2.2. Methoden.....	21
2.2.1. Maushaltung und Genotypisierung.....	21
2.2.2. DRG-Neuronen-Präparation .....	22

2.2.3. Herstellung eines NPY-Venus Lenti-Plasmids.....	23
2.2.4. Virus-Produktion.....	27
2.2.5. Transduktion.....	29
2.2.6. Fluoreszenzmikroskopie .....	30
2.2.6.1. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) und Stimulation der LDCV-Sekretion.....	31
2.2.6.2. Calcium-Imaging.....	36
2.2.7. Modulation der LDCV-Sekretion durch NPY-Applikation .....	38
2.2.8. Patch-Clamp-Technik.....	40
2.2.9. Immunocytochemie und Laser Scan Mikroskopie (LSM) .....	42
2.2.10. Statistische Analysen .....	46
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1. Induktion von LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen.....	47
3.2. Analyse von Sekretionstypen in DRG-Neuronen.....	52
3.3. Modulation der Sekretion von LDCVs durch NPY .....	63
3.4. Aufklärung des Mechanismus der Modulation durch NPY .....	70
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>80</b>
4.1. Die Freisetzung von LDCVs in DRG-Neuronen geschieht hauptsächlich bei hochfrequenter Stimulation.....	80
4.2. DRG-Neurone besitzen verschiedene Typen der Exozytose von LDCVs .....	85
4.3. NPY erhöht die Rate der Sekretion von LDCVs aus DRG-Neuronen .....	90
4.4. NPY aktiviert Proteinkinase A in DRG-Neuronen .....	93
4.5. Relevanz der Arbeit und Ausblick.....	94
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
<b>Publikationen &amp; Konferenzbeiträge .....</b>	<b>104</b>
Eigene Publikationen .....	104
Konferenzbeiträge/Posterpräsentationen .....	104
<b>Danksagungen.....</b>	<b>105</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
Ω	Ohm
%	Prozent
A	Ampere
AC	Adenylatcyclase
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
AOTF	Acousto Optic Tunable Filter
ApE	A plasmid Editor
Ar	Argon
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CREB	cAMP response element-binding protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRG	dorsal root ganglion (Spinalganglion; Hinterwurzelganglion)
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
engl.	englisch
ERK	extracellular-signal regulated kinase
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidium Bromid
F	Farad
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FUDR	2'-Deoxy-5-fluorouridin
g	Gramm
GPCR	G protein-coupled receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde(n)
HEK	human embryonic kidney (humane embryonale Niere)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HPLC	high performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
hrGFP	humanized <i>Renilla</i> green fluorescent protein
Hz	Hertz
K <sup>+</sup>	Kalium
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
l	Liter
LB	loading buffer (Ladepuffer)
LB-Medium	Lysogeny broth-medium
LDCV	„large dense-core“ Vesikel (elektronendichtes Granulum)
LSM	Laser Scan Mikroskopie
m	Meter
m-	milli
M	Mol/l
M-	mega
μ-	micro
min	Minute(n)
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
n	Anzahl an Experimenten
n-	nano
NBA	Neurobasal A
NEAA	non-essential amino acids (nicht-essentielle Aminosäuren)
NGF	Nerve Growth Factor
NGS	normal goat serum (normales Ziegeserum)
NPY	Neuropeptid Tyrosin
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
ori	origin of replication
Osm	Osmol
P	Einheit für statistische Wahrscheinlichkeit
p-	pico
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
<i>pfu</i> Polymerase	<i>pyrococcus furiosus</i> Polymerase
pH	potentia Hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität)
PKA	Proteinkinase A
PP	pankreatisches Polypeptid
PYY	Peptid YY
rcf	relative centrifugal force (Relative Zentripetalbeschleunigung)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde(n)
SAP	shrimp alkaline Phosphatase
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)

SFV	Semliki Forest Virus
SNAP-25	synaptosomal-associated protein 25
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt
SP	Substanz P
SV	synaptisches Vesikel
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TIRFM	total internal reflection fluorescence microscopy (interne Totalreflektions-Mikroskopie)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-SNARE	target-SNARE (SNARE Protein in der Zielmembran)
U	Units (enzymatische Einheit)
UV	ultraviolett
V	Volt
VAMP	vesicle-associated membrane protein
VDCC	voltage-dependent calcium channel (spannungsabhängiger Calciumkanal)
v-SNARE	vesicular-SNARE (SNARE Protein in der Vesikelmembran)
wt	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	: Schema zur Unterteilung von DRG-Neuronen nach Größe, Art des Axons, Innervation und Wahrnehmung und Darstellung der jeweiligen Projektionen in verschiedene Regionen des Rückenmarks.....	<b>2</b>
<b>Abbildung 2</b>	: Vektorkarte des „pRRL.sin.cPPT.CMV.WPRE lentiviral transfer vector“. ....	<b>24</b>
<b>Abbildung 3</b>	: Schematische Darstellung von TIRFM (modifiziert nach (Steyer und Almers, 2001)).....	<b>32</b>
<b>Abbildung 4</b>	: Schematische Darstellung der Stimulation von DRG-Neuronen durch Applikation einer 60 mM KCl-Lösung.....	<b>33</b>
<b>Abbildung 5</b>	: Schematische Darstellung der Stimulationsprotokolle für alle getesteten Feldelektrodenstimulationen.....	<b>35</b>
<b>Abbildung 6</b>	: Calciumabhängiges Emissionsspektrum des Calciumindikators Fura-2. ....	<b>37</b>
<b>Abbildung 7</b>	: Schematische Darstellung des Stimulationsprotokolls zur Untersuchung der Modulation der LDCV-Sekretion durch NPY. ....	<b>39</b>
<b>Abbildung 8</b>	: Schematische Darstellung des Stimulationsprotokolls zur Untersuchung des durch NPY aktivierten Signalweges. ....	<b>40</b>
<b>Abbildung 9</b>	: Feldelektrodenstimulation und Applikation einer 60 mM Kaliumlösung rufen ähnliche Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in DRG-Neuronen hervor. ....	<b>48</b>
<b>Abbildung 10</b>	: Sowohl 60 mM Kaliumlösung als auch Feldelektrodenstimulation induzieren LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen. Am effektivsten löst eine Langzeit-Feldelektrodenstimulation mit niederfrequentem Prästimulus LDCV-Exozytose aus. ....	<b>49</b>
<b>Abbildung 11</b>	: Die mittlere Latenzzeit des ersten sezernierten LDCVs nach Beginn der Stimulation unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Stimulationsarten.....	<b>51</b>
<b>Abbildung 12</b>	: DRG-Neurone besitzen verschiedene Modi der Exozytose von LDCVs. ....	<b>54</b>
<b>Abbildung 13</b>	: Exozytoseereignisse können anhand der Anstiegszeit der Fluoreszenz in 2 Kategorien unterteilt werden.....	<b>55</b>
<b>Abbildung 14</b>	: „Full Fusion“-Exozytose ist der vorrangig auftretende Modus der Freisetzung bei Feldelektrodenstimulation. ....	<b>56</b>
<b>Abbildung 15</b>	: Grafische Darstellung untersuchter Parameter der Kinetik von Fusionsereignissen. ....	<b>57</b>

<b>Abbildung 16</b> : Die mittlere Anstiegszeit der Fluoreszenzintensität von Exozytoseereignissen verschiedener Fusionstypen unterscheidet sich jeweils nicht signifikant zwischen Stimulationsarten. ....	<b>58</b>
<b>Abbildung 17</b> : Die mittlere Breite der Spitzenamplitude von Exozytoseereignissen verschiedener Fusionstypen unterscheidet sich jeweils nicht signifikant zwischen Stimulationsarten. ....	<b>59</b>
<b>Abbildung 18</b> : Die mittlere Abfallszeit der Fluoreszenzintensität von Exozytoseereignissen verschiedener Fusionstypen unterscheidet sich jeweils nicht signifikant zwischen Stimulationsarten. ....	<b>60</b>
<b>Abbildung 19</b> : Fusionstypen treten nicht zu bestimmten Zeitpunkten nach Beginn einer Stimulation auf. ....	<b>61</b>
<b>Abbildung 20</b> : NPY sensibilisiert DRG-Neurone für niederfrequente Stimulationen. ....	<b>64</b>
<b>Abbildung 21</b> : NPY beeinflusst die mittlere Latenzzeit des ersten sezernierten Vesikels nicht. ....	<b>66</b>
<b>Abbildung 22</b> : NPY hat keinen Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Fusionstypen. ....	<b>67</b>
<b>Abbildung 23</b> : Bis auf die Verzögerung des Schließens der Fusionspore in „Kiss and Stay“-Ereignissen hat NPY keinen Einfluss auf die Kinetik verschiedener Fusionstypen. ....	<b>68</b>
<b>Abbildung 24</b> : NPY hat keinen Einfluss auf die Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ bei Stimulation. ....	<b>71</b>
<b>Abbildung 25</b> : NPY aktiviert den PKA-Signalweg in DRG-Neuronen. ....	<b>73</b>
<b>Abbildung 26</b> : NPY vermittelt die Sensibilisierung von DRG-Neuronen für niederfrequente Stimulationen über die Aktivierung der PKA. ....	<b>75</b>
<b>Abbildung 27</b> : NPY führt zu einer verspäteten Aktivierung spannungsabhängiger Natrium- und Calciumkanäle in DRG-Neuronen.....	<b>77</b>



## Zusammenfassung

Neurone der Spinalganglien (engl.: dorsal root ganglion neurons; DRG-Neurone; Neurone der Hinterwurzelganglien) sind ein wichtiger Vermittler verschiedener Sinneswahrnehmungen. Von besonderem wissenschaftlichen Interesse ist die Schmerzwahrnehmung. DRG-Neurone können die Schmerzwahrnehmung durch die Freisetzung von Neuromodulatoren wie Substanz P (SP), Calcitonin gene-related peptide (CGRP) oder Neuropeptid Y (NPY) aus elektronendichten Granula (engl.: large dense-core vesicles; LDCVs) auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Die Wirkung dieser Modulatoren auf die Reizweiterleitung an Synapsen ist gut untersucht, welchem Mechanismus ihre Freisetzung unterliegt, jedoch kaum.

In dieser Arbeit wurde die Sekretion NPY-Venus markierter LDCVs in DRG-Neuronen durch Einsatz interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (engl.: total internal reflection fluorescence microscopy; TIRFM) und Feldelektrodenstimulation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch einen Puls von 100  $\mu$ A Amplitude, einer Dauer von 3 ms bei 100 Hz, mit vorhergehendem 5 Hz-Prästimulus, eine robuste Sekretion von LDCVs am Soma von DRG-Neuronen erzeugt wird. Die Verbindung zwischen dem Zeitpunkt der Stimulation und der dadurch induzierten Sekretion von LDCVs ist mit  $28.3 \pm 5.9$  s sehr schwach. Weiter wurde beobachtet, dass der bevorzugte Modus der LDCV-Freisetzung bei Feldelektrodenstimulation „Full Fusion“-Exozytose ist. Induziert man Sekretion hingegen durch Applikation einer 60 mM Kaliumlösung, treten die drei Fusionstypen „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ mit gleicher Wahrscheinlichkeit auf.

In Publikationen wurde gezeigt, dass neuromodulatorische Substanzen beispielsweise den Einstrom von Calcium in das Soma von DRG-Neuronen verändern können. Daraus ergibt sich die Möglichkeit der Beeinflussung der LDCV-Sekretion selbst. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit bestätigt. Die Applikation des natürlich in DRG-Neuronen vorkommenden NPY in einer Konzentration von 0,05  $\mu$ M auf DRG-Neurone in Kultur führt bereits bei einer niederfrequenten Stimulation zu einer maximalen Sekretionsrate der LDCVs von 0,016 LDCVs/s. Weiterhin werden pro Zelle durchschnittlich mehr LDCVs freigesetzt als in Kontrollzellen und die Sekretionsrate bleibt konstant hoch. NPY bewirkt also eine Sensibilisierung von DRG-Neuronen hinsichtlich der Freisetzung von LDCVs. In Patch-Clamp-Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Sensibilisierung möglicherweise auf eine Verschiebung des Ruhemembranpotentials zurückzuführen ist. Schließlich wurde durch immunzytochemische Färbungen und Experimente mit TIRFM nachgewiesen, dass NPY zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) und der Proteinkinase A (PKA) führt.

In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Freisetzung von LDCVs aus DRG-Neuronen gewonnen werden. Es wurde unter anderem gezeigt, dass verschiedene Modi der Exozytose von LDCVs existieren und dass deren Inhalt eine auto- oder möglicherweise auch parakrine Wirkung auf seine eigene Freisetzbarkeit besitzt.

## Summary

### **„Study on the releasability and the mode of secretion of large dense-core vesicles (LDCVs) from dorsal root ganglion (DRG) neurons of the mouse and their interference by neuropeptide Y (NPY)“**

Dorsal root ganglion (DRG) neurons are an important mediator of various sensory perceptions. Of particular scientific interest is the perception of pain. Through the release of neuromodulators like substance P (SP), Calcitonin gene-related peptide (CGRP) or neuropeptide Y (NPY) from large dense-core vesicles (LDCVs), DRG neurons can influence pain perception in several ways. The action of neuromodulators on synaptic transmission is well studied, however the mechanism underlying their release, is poorly understood.

In this work the secretion of NPY-Venus labeled LDCVs was studied in DRG neurons using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) and field electrode stimulation. It could be shown that a pulse of 100  $\mu$ A amplitude and 3 ms duration at 100 Hz with a preceding 5 Hz prestimulus, evokes robust LDCV secretion from DRG somata. The stimulation-secretion coupling, i.e. the timespan between onset of stimulation and release of LDCVs, is with  $28.3 \pm 5.9$  s very weak. With field electrode stimulation the preferential mode of secretion is full fusion, however application of a 60 mM potassium solution to induce secretion evokes all three modes of exocytosis (full fusion, kiss-and-run and kiss-and-stay) with the same probability.

In literature it was shown that neuromodulatory substances can for example change calcium influx into the DRG soma, thus providing the possibility to influence LDCV release itself. This hypothesis was corroborated in this work. Application of NPY, i.e. endogenously expressed in DRG neurons, in a concentration of 0.05  $\mu$ M to DRG neurons in culture, leads to a maximal LDCV secretion rate of 0,016 LDCVs/s already at 5 Hz stimulation. Furthermore, the amount of secreted LDCVs per cell is increased in comparison to control cells and the rate of secretion stays constantly high. This means that NPY leads to a sensitization of DRG neurons in regard to LDCV secretion. Using the patch-clamp-technique we could show that the sensitization of the neurons is probably due to a shift in resting membrane potential. Finally, immunocytochemistry and TIRFM experiments unraveled that the NPY induced enhancement of secretion was due to the activation of adenylate cyclase (AC) and protein kinase A (PKA).

In this thesis new insights in the release of LDCVs from DRG Neurons could be gathered. Among other things it could be shown that different modes of exocytosis do exist for LDCVs and that their content is capable to affect its own releasability in an auto- or probably paracrine manner.

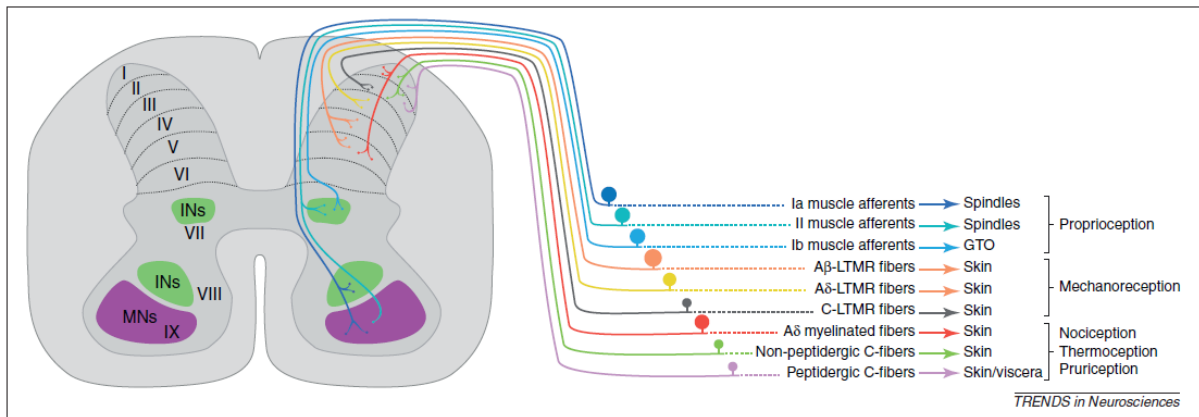
## 1. Einleitung

Die Erforschung von Sinneswahrnehmungen ist seit jeher von großem Interesse. Besonders wichtig wird dies, wenn Wahrnehmungen schmerzhafter Natur sind. Jeder Mensch macht in seinem Leben die Erfahrung von Schmerz, wenn auch dessen Intensität von Person zu Person sehr unterschiedlich empfunden wird. Wird Schmerz zudem chronisch, stellt dies eine große Belastung für die Betroffenen dar. Daher ist es wichtig, die Mechanismen, die hinter der Entstehung von (chronischem) Schmerz stehen, aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden im Folgenden Neurone der Spinalganglien (engl.: dorsal root ganglion (DRG) neurons) untersucht, die für die Empfindung vieler verschiedener Wahrnehmungen, unter anderem Schmerz, verantwortlich sind.

### 1.1. Neurone der Spinalganglien (DRG-Neurone)

DRG-Neurone sind die Mediatoren, die uns den Sinn des „Fühlens“ vermitteln. Bei ihnen handelt es sich um spezialisierte sensorische Neurone, die morphologisch eine pseudounipolare Form aufweisen. Sie bestehen aus einem peripheren Axon, dessen Ende in der Haut, an Muskeln oder Gelenken liegt, einem Zellkörper und einem zentralen Axon, welches Reize in das Rückenmark weiterleitet. Die Zellkörper befinden sich gebündelt in den Spinalganglien (DRG), zusammen mit speziellen sie umgebenden Gliazellen, den sogenannten Mantelzellen. Die DRGs liegen beidseitig in den Zwischenwirbellöchern jedes Rückenmarksegments.

DRG-Neurone kann man grob anhand ihrer Sinneswahrnehmung in verschiedene Gruppen unterteilen: Nozizeptoren, Mechanorezeptoren und Propriozeptoren. Die Art der Wahrnehmung wird durch die vorhandenen Rezeptoren in der peripheren Endigung, aber auch durch die Expression diverser anderer Proteine in einem Neuron definiert. Anhand dieser Proteinzusammensetzung kann man die Neurone in weitere Untergruppen unterteilen. Auch die Morphologie der Axone und die Region, in die Neurone ins Rückenmark projizieren, spielen bei der Kategorisierung der Neurone eine wichtige Rolle. Abbildung 1 zeigt eine grobe Übersicht über die verschiedenen Klassen der DRG-Neurone.



**Abbildung 1 : Schema zur Unterteilung von DRG-Neuronen nach Größe, Art des Axons, Innervation und Wahrnehmung und Darstellung der jeweiligen Projektionen in verschiedene Regionen des Rückenmarks.** Die Größe der DRG-Neurone ist codiert über die Größe des Ganglions, die Beschaffenheit der Axone ist beschrieben durch Ia, Ib, II bzw. A $\beta$ , A $\delta$  und C. Des Weiteren ist abzulesen, welches Organ die jeweilige Gruppe innerviert, welche Wahrnehmung sie vermittelt und in welche Region des Rückenmarks der Reiz weitergeleitet wird (INs = Interneurone, MNs = Motorneurone, I-IX = Laminae) (Abbildung aus: Lallend und Ernors (2012)).

Fasern, die Muskeln oder das Golgi-Sehnenorgan (engl.: Golgi tendon organ, GTO) innervieren, werden in Typ Ia, Ib, II, III und IV Fasern eingeteilt (Unterteilung nach Lloyd und Hunt, 1943). Innervieren Fasern die Haut, so erfolgt die Unterteilung nach Gasser und Grundfest (1939) in A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\delta$  und C-Fasern. Typ Ia und Ib Fasern innervieren Muskelspindeln und das GTO. Sie sind myelinisiert und besitzen einen großen Axon-Durchmesser von 13-20  $\mu\text{m}$ , woraus sich eine Nervenleitgeschwindigkeit von 80-120 m/s ergibt. Diesen Fasern entsprechen nach Gasser und Grundfest A $\alpha$  Fasern in der Haut. Die nächste Gruppe sind Typ II bzw. A $\beta$  Fasern, die Muskelspindeln innervieren bzw. Mechanorezeptoren in der Haut darstellen. Der Durchmesser ihrer Axone beträgt 6-12  $\mu\text{m}$ , sie sind myelinisiert und besitzen eine Leitgeschwindigkeit von 30-75 m/s. Typ III bzw. A $\delta$  Fasern besitzen dünn myelinisierte Axone von 1-5  $\mu\text{m}$  Durchmesser und eine Leitgeschwindigkeit von 3-30 m/s. Sie können Mechanorezeptoren, Nozizeptoren aber auch Thermorezeptoren für kalte Temperaturen sein. Typ IV bzw. C-Fasern schließlich sind die einzigen Fasern ohne Myelinisierung. Der Durchmesser ihrer Axone beträgt lediglich 0,2-1,5  $\mu\text{m}$ , wodurch sie die deutlich geringste Leitgeschwindigkeit von 0,5-2 m/s besitzen. Sie sind Nozizeptoren und Thermorezeptoren für Wärme. Neurone der C-Fasern kann man des Weiteren in peptiderge und nicht-peptiderge Neurone unterteilen. Peptiderge Neurone können neuromodulatorische Substanzen wie Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Substanz P (SP) oder Neuropeptid Y (NPY) in elektronendichten Granula (engl.: large dense-core vesicles; LDCVs) speichern und durch Exozytose aus der Zelle freisetzen (Hokfelt et al.,

1980; Schoenen et al., 1989). Nicht-peptiderge Neurone besitzen hingegen nur wenige LDCVs und es konnten in diesen Zellen bisher nur nach Verletzungen von Nervenfasern neuromodulatorische Substanzen nachgewiesen werden (Zhang et al., 1995a).

Zur Signaltransduktion ins Rückenmark benutzen DRG-Neurone den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat, den sie an Synapsen aus synaptischen Vesikeln (SVs) in den synaptischen Spalt freisetzen. Für peptiderge Neurone gibt es, wie bereits erwähnt, noch eine weitere Möglichkeit der Signalübertragung. Sie können über elektronendichte Granula verschiedenste neuromodulatorische Substanzen freisetzen und so auto- aber auch parakrine Wirkungen ausüben (Landry et al., 2003).

## 1.2. LDCVs in DRG-Neuronen

LDCVs sind in Neuronen neben SVs ein wichtiges Organell zur Speicherung und Freisetzung von Botenstoffen. Sie unterscheiden sich von SVs durch ihren Inhalt, den Ort der Freisetzung, die Calciumabhängigkeit ihrer Exozytose und dementsprechend der Stärke des zur Freisetzung benötigten Stimulus (Ghijsen und Leenders, 2005; Hokfelt, 1991; Hokfelt et al., 2000; Huang und Neher, 1996). In DRG-Neuronen setzen SVs den Neurotransmitter Glutamat frei, wohingegen LDCVs in ihrem Inhalt sehr unterschiedlich sein können (bspw. SP, CGRP, NPY ...). Zudem wurde gezeigt, dass nach einer akuten Verletzung oder Kultivierung der Neurone die Expression einiger dieser Botenstoffe verändert ist (Landry et al., 2005; Schoenen et al., 1989; Zhang et al., 1995a). Weiterhin ist ein Merkmal von DRG-Neuronen, dass sie oft nicht nur einen bestimmten Botenstoff exprimieren, sondern in einem Neuron verschiedene Stoffe gleichzeitig vorkommen (Gibbins et al., 1987; Merighi et al., 1988; Zhang et al., 1995a). Zudem werden die verschiedenen Substanzen in der Regel nicht in individuellen LDCVs gespeichert, sondern viel eher liegt in LDCVs immer ein Gemisch dieser vor (Merighi, 2002; Merighi et al., 2011; Salio et al., 2007).

Die Freisetzung von SVs erfolgt immer an spezialisierten Orten von Neuronen, den Synapsen. Dort liegen sie sehr nah an spannungsabhängigen Calciumkanälen und können, auf einen Stimulus hin, binnen Millisekunden freigesetzt werden (Neher, 1998). Durch die Öffnung der Calciumkanäle entstehen sog. Calcium-Microdomänen, in denen eine Calciumkonzentration von bis zu 100  $\mu\text{M}$  herrscht. LDCVs besitzen keine definierte Region in der Zelle, an der sie freigesetzt werden. Sie können sowohl am Axon als auch am Soma von Neuronen sezerniert

werden (Huang und Neher, 1996; Xia et al., 2009). Dies legt nahe, dass für die Exozytose von SVs eine wesentlich höhere Calciumkonzentration nötig ist als für LDCVs, da eine solch hohe Konzentration wie in den Calcium-Microdomänen der Synapsen, im Cytosol der Zelle nicht vorkommen kann. Des Weiteren wurde in DRG-Neuronen gezeigt, dass neben einer calciumabhängigen auch eine calciumunabhängige Exozytose von LDCVs stattfinden kann (Huang und Neher, 1996; Zhang und Zhou, 2002; Zheng et al., 2009).

Generell ist über den Mechanismus der Freisetzung von LDCVs in Neuronen wenig bekannt. Hauptsächlich wurde die Exozytose von SVs in Neuronen oder von LDCVs in neuroendokrinen Zellen, wie beispielsweise Chromaffinzellen, untersucht (Becherer und Rettig, 2006). Verallgemeinernd kann gesagt werden, dass die Hauptkomponenten der Freisetzungsmaschinerie für beide Arten von Vesikeln sehr ähnlich sind. Beiden gemein ist der sog. SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor)-Komplex und einige andere Komponenten, die Vesikel in einen fusionskompetenten Zustand versetzen (Becherer und Rettig, 2006; Martin, 2003). Dieser SNARE-Komplex vermittelt, mithilfe weiterer Proteine, das feste Binden der Vesikel an den Ort der Exozytose (Docking und Priming) und die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran der Zelle. Er besteht aus dem v (engl.: vesicle oder vesicular)-SNARE VAMP (engl.: vesicle-membrane associated protein) und den t (engl.: target)-SNAREs SNAP-25 (synaptosomal-associated protein 25) und Syntaxin. Weiterhin wurde gezeigt, dass SVs in Neuronen und LDCVs in Chromaffinzellen in verschiedenen „Pools“ vorliegen. Dies bedeutet, dass Vesikel zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Stimulation freigesetzt werden, da sie sich nicht alle im gleichen Reifungsstadium der Exozytose befinden (Rettig und Neher, 2002; Schneggenburger et al., 2002; Sorensen, 2004). In diesem Fall lassen sich die Eigenschaften von SVs und LDCVs sehr gut vergleichen, da in Chromaffinzellen LDCVs anhand ihrer Funktion mit SVs in Neuronen gleichzusetzen sind. Möchte man LDCVs in Chromaffinzellen bzw. SVs in Neuronen mit LDCVs in Neuronen gleichsetzen, ist dies nur schwer möglich, denn in Neuronen sind LDCVs nicht die Hauptinformationsträger. Ihre Aufgabe ist die Freisetzung neuromodulatorischer Substanzen und somit die Modifikation der Reizweiterleitung (Merighi et al., 2011). Bisher konnte gezeigt werden, dass sie überall entlang eines Neurons freigesetzt werden können, dass dies aber nach einem Stimulus mit erheblicher Verzögerung geschieht (Xia et al., 2009). Dies ist auch verständlich, da sie sich bei Stimulation, im Vergleich zu SVs, nicht zwingend in direkter Nähe zu Calciumkanälen befinden (Martin, 2003). Somit dauert es länger, bis die

intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) von 3-10  $\mu M$ , die zur Einleitung ihrer Freisetzung benötigt wird (Huang und Neher, 1996), erreicht wird. Definierte Pools wie für SVs in Neuronen bzw. LDCVs in Chromaffinzellen konnten bisher in DRG-Neuronen noch nicht beobachtet werden. So bleiben der Mechanismus der LDCV-Freisetzung und der physiologische Reiz, der hierfür benötigt wird, in Neuronen bislang ungeklärt.

### 1.3. Exozytose von Vesikeln

Wie bereits beschrieben können SVs und LDCVs nach Bildung eines stabilen SNARE-Komplexes mit der Plasmamembran der Zelle auf einen Calciumeinstrom in die Zelle hin fusionieren. Diese Fusion läuft allerdings nicht immer nach dem gleichen Schema ab, sondern es wurden verschiedene Modi der Exozytose gefunden. Für beide Arten von Vesikeln gibt es Gründe, die das Vorhandensein mehrerer Modi der Freisetzung rechtfertigen.

Die Membran von SVs an Synapsen kann nach Fusion mit der Plasmamembran durch Endozytose recycelt werden. Außerdem gibt es spezielle Transporter, die SVs mit neu synthetisiertem oder von der Zelle wieder aufgenommenem Neurotransmitter in der Synapse befüllen können. Da Synapsen oft in einiger Entfernung vom Zellkörper liegen, in dem Vesikel und deren Inhalt neu synthetisiert werden können, wird durch das Recycling ein ständiges Vorhandensein von SVs und somit die Bereitschaft der Neurone zur Reizweiterleitung gewährleistet. Für LDCVs gibt es diesen Mechanismus nicht (Hokfelt et al., 1980; Merighi et al., 2011). Sie müssen immer wieder im Soma der Neurone mit neu synthetisierten Botenstoffen befüllt und von dort zum Ort der Freisetzung transportiert werden (Zhang et al., 2010). Beide Mechanismen der Bereitstellung neuer, befüllter Vesikel sind mit einem hohen Energieaufwand und Zeitverlust verbunden. Um ein Vesikel bzw. dessen Inhalt mehrmals und somit effizienter nutzen zu können, gibt es neben der „Full Fusion“ (vollständige)-Exozytose, bei der die Vesikelmembran vollständig mit der Plasmamembran verschmilzt und der gesamte Inhalt der Vesikel freigesetzt wird, noch die „Kiss and Run“-Exozytose (An und Zenisek, 2004; Becherer und Rettig, 2006; Rizzoli und Jahn, 2007). Bei dieser verschmilzt die Membran eines Vesikels nur teilweise mit der Plasmamembran und gibt so nur einen Teil des Inhalts in das extrazelluläre Milieu frei. Anschließend verschließt sich diese Fusionspore wieder und das Vesikel entfernt sich mit

seinem restlichen Inhalt von der Plasmamembran. Des Weiteren existiert noch die „Kiss and Stay“-Exozytose. Sie ist ähnlich zu „Kiss and Run“, allerdings bleibt hier das einmal fusionierte Vesikel weiterhin an der Membran, um noch weitere Male am gleichen Ort fusionieren zu können. Die Bezeichnungen dieser Fusionsarten variieren zwischen einzelnen Forschungsgruppen stark (de Wit et al., 2009; Rizzoli und Jahn, 2007).

#### 1.4. Neuropeptid Tyrosin (NPY)

Neuropeptid Tyrosin (NPY) ist ein 36 Aminosäuren langes (Tatemoto, 1982), im zentralen und peripheren Nervensystem sehr häufig vorkommendes Peptid, das zusammen mit dem pankreatischen Polypeptid (PP) und Peptid YY (PYY) zur Familie der pankreatischen Polypeptide (PP) gehört. Aufgrund seines weitverbreiteten Vorkommens im Körper besitzt es diverse physiologische Funktionen (Adrian et al., 1983; Allen et al., 1983). Im Gehirn ist es das am häufigsten vorkommende Neuropeptid. Es vermittelt seinen Effekt, wie die meisten Neuropeptide (Merighi et al., 2011), durch die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Bisher wurden fünf verschiedene NPY-Rezeptoren identifiziert:  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_4$ ,  $Y_5$  und  $y_6$ . Im Gehirn und in DRG-Neuronen wurde das Vorkommen von  $Y_1$  und  $Y_2$  gezeigt (Aicher et al., 1991; Brumovsky et al., 2005; Brumovsky et al., 2002). In DRG-Neuronen befindet sich  $Y_1$  auf kleinen, peptidergen Neuronen (Zhang et al., 1994), während  $Y_2$  sowohl auf kleinen peptidergen als auch auf nicht-peptidergen Neuronen gefunden wurde (Brumovsky et al., 2005).

Neben seiner Rolle bei der Hormonsekretion (Kalra und Crowley, 1984), der Regulierung des zirkadianen Rhythmus (Albers und Ferris, 1984) und der Nahrungsaufnahme (Clark et al., 1984; Levine und Morley, 1984; Stanley und Leibowitz, 1984) konnte für NPY im Hippocampus auch gezeigt werden, dass es zu einem reduzierten Calciumeinstrom und somit zur Inhibierung der exzitatorischen Reizweiterleitung an der Präsynapse führt (Colmers et al., 1988).

Ein wichtiges Forschungsfeld ist auch die Rolle von NPY bei der Schmerzwahrnehmung, die Hua et al. (1991) schon früh beschrieben. Hierbei ist es nicht nur im Gehirn, sondern auch in DRG-Neuronen von großer Bedeutung. In gesunden Neuronen ist es in sehr geringen Mengen, in LDCVs im Soma und Axon kleiner, peptiderger Neurone und deren Terminalen in Laminae I und II des Rückenmarks zu finden (Zhang et al., 1995a). Nach Läsion des



peripheren Axons steigt die Expression von NPY stark, vor allem in mittelgroßen und großen DRG-Neuronen, wo es dann neben der Lokalisation in LDCVs auch im Soma der Zellen vorkommt (Zhang et al., 1995a).

Für die Funktion von NPY in der Schmerzwahrnehmung wurde bisher gezeigt, dass es die Freisetzung von SP in DRG-Neuronen reduziert (Walker et al., 1988). Des Weiteren führt NPY über die Bindung an  $Y_2$ -Rezeptoren zu einem reduzierten Calciumeinstrom in DRG-Neurone und somit zu einer reduzierten Freisetzung von Glutamat an Synapsen (Bleakman et al., 1991). Zudem konnte beobachtet werden, dass NPY im Rückenmark über die Bindung an  $Y_1$  die Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter wie GABA oder Glycin auf inhibitorische Neurone hemmen kann (Smith et al., 2007). Außerdem kann NPY die Erregbarkeit von DRG-Neuronen, durch Unterdrückung des Calciumstroms durch N-Typ Calciumkanäle und somit im Folgenden einer Verringerung der calciumsensitiven Kaliumleitfähigkeit nach Aktivierung von  $Y_2$  erhöhen (Abdulla und Smith, 1999). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte, dass die Aktivierung von  $Y_1$  den Calciumstrom durch L-Typ Calciumkanäle erhöht. Endoh et al. (2012) wiesen in submandibularen Ganglion-Neuronen nach, dass ein erhöhter Calciumeinstrom durch L-Typ Calciumkanäle über die Aktivierung von Adenylatcyclase (AC) und Proteinkinase A (PKA) vermittelt wird. Und schließlich führte eine Stimulation von  $Y_1$  und  $Y_2$  Rezeptoren zu einer Inhibierung des axonalen Transportes durch Inhibierung der AC und PKA. Generell wird NPY ein schmerzlindernder Effekt zugewiesen, was auch in Verhaltensexperimenten an gentechnisch veränderten NPY-knockout-Mäusen gezeigt wurde (Shi et al., 1998).

## 1.5. Fragestellung der Arbeit

In DRG-Neuronen wurde bis heute eine Vielzahl neuromodulatorischer Substanzen gefunden. Diese kommen hauptsächlich in an der Schmerzwahrnehmung beteiligten Neuronen vor, also peptidergen C-Fasern, weshalb die Untersuchung ihrer Funktion von großer Bedeutung ist. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits das Vorkommen neuromodulatorischer Substanzen und ihrer Rezeptoren, deren Veränderung im Expressionslevel und -muster nach Verletzungen und deren Funktion in der Zelle nach Bindung an ihre Rezeptoren erforscht (Brumovsky et al., 2005; Schoenen et al., 1989; Zhang et al., 1995a; Zhang et al., 1995b). Man weiß daher bereits viel über die möglichen

Funktionen verschiedener Neuromodulatoren, allerdings wurde bisher in Neuronen kaum untersucht, welcher Mechanismus deren Freisetzung zugrunde liegt.

Aufgrund der geringen Kenntnis über die Freisetzung von LDCVs aus Neuronen sollte dies in dieser Arbeit an DRG-Neuronen untersucht werden. Zunächst galt es, durch Einsatz interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) und einer elektrischen Feldelektrodenstimulation einen Stimulus zu konzipieren, der am Soma von DRG-Neuronen eine robuste LDCV-Sekretion hervorruft. Für SVs geschieht die Freisetzung nach Stimulation binnen Millisekunden, für LDCVs wurde in hippocampalen Neuronen hingegen eine nur schwache Stimulus-Sekretions-Beziehung (16 s) gefunden (Xia et al., 2009). Daher sollte im nächsten Schritt diese Beziehung zwischen dem Zeitpunkt der Stimulation und der Sekretion von LDCVs ermittelt werden. Weiter ist bekannt, dass für die Freisetzung von Vesikeln verschiedene Modi wie „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ existieren (Becherer und Rettig, 2006; de Wit et al., 2009). Da diese Fusionstypen Neuronen eine Möglichkeit der Regulation der Freisetzung neuromodulatorischer Substanzen bieten, sollte geklärt werden, ob diese auch in DRG-Neuronen für die Exozytose von LDCVs existieren und welcher Modus bevorzugt genutzt wird. DRG-Neurone exprimieren neben verschiedenen Neuromodulatoren auch deren Rezeptoren. Daher sollte schließlich untersucht werden, ob einer dieser Neuromodulatoren (NPY), der besonders nach Verletzungen von Nerven stark in DRG-Neuronen exprimiert wird und eine wichtige Rolle in der Schmerzwahrnehmung spielt, einen Effekt auf die Freisetzung von LDCVs und somit eine autokrine oder möglicherweise parakrine Wirkung auf seine eigene Freisetzung besitzt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agar Agar	Roth
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth
L-Aspartat	Sigma-Aldrich
B27-Supplement	Life Technologies
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Roth
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck
Chloroform	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
dNTP-Mix	Fermentas
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Life Technologies
Ethanol (100 %)	Roth
Ethidium Bromid (EtBr)	Life Technologies
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Fetal Calf Serum (FCS)	Life Technologies
Formaldehyd (Methanol frei)	Polyscience
Forskolin	Sigma-Aldrich
Fura-2 AM	Life Technologies
2'-Deoxy-5-fluorouridin (FUDR)	Sigma-Aldrich
Glucose	Merck
Glutamax-Stock	Life Technologies
Glycerol	Roth
Glycin	Roth

Substanz	Hersteller
Hefeextrakt	Roth
H-89	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
HEPES-buffer	Life Technologies
HPLC Wasser	Merck
Isopropanol	Roth
Kanamycin K-1377 (30 mg/ml)	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
$\lambda$ Marker (DNA Standard)	Roche
Lipofectamin 2000	Life Technologies
MgATP	Sigma-Aldrich
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Merck
Mowiol 4-88	Calbiochem
NaCl	Merck
$\text{Na}_2\text{GTP}$	Sigma-Aldrich
$\text{NaHCO}_3$	Merck
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck
Neuropeptide Y peptide	Abcam
Non-Essential Amino Acids (NEAA)	Life Technologies
Neurobasal A	Life Technologies
Normales Ziegenserum (NGS)	Panbiotech
Optimem	Life Technologies
PCR-Puffer (10x)	Sigma-Aldrich
Penicillin	Life Technologies
Pepton	Roth
<i>pfu</i> -Polymerase-Puffer (10x)	Fermentas
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Puffer 2	New England Biolabs
Phenol	Sigma-Aldrich
RPMI	Sigma-Aldrich

Substanz	Hersteller
Sodiumpyruvat	Life Technologies
Streptomycin	Life Technologies
Sucrose	Merck
Trishydrochlorid	Roth
Triton X-100	Roth
Tryptosephosphat	Life Technologies
Uridin	Sigma-Aldrich
Wasser	Sigma-Aldrich

### 2.1.2. Enzyme

Enzym	Hersteller
T4 DNA Ligase (1000 U)	Fermentas
Liberase DH Research Grade	Roche
<i>pfu</i> Polymerase	Fermentas
Quick Extrakt	Epicentre Biotechnologies/Biozym
REDTaq DNA Polymerase	Sigma-Aldrich
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) I	New England Biolabs

Restriktionsenzym	Hersteller
<i>Bam</i> HI	Thermo Fisher Scientific
<i>Bsa</i> I	New England Biolabs
<i>Msp</i> I	New England Biolabs
<i>Nhe</i> I	Fermentas

### 2.1.3. Lösungen

#### Blockierungslösung:

NGS  
in Tris-NaCl                      5 %

DRG intrazelluläre Patch-Clamp Lösung „D19“:

L-Aspartat	135 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1 mM
HEPES	10 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	3 mM
Cs-EGTA	5 mM
MgATP	2 mM
Na <sub>2</sub> GTP	0,3 mM
pH: 7,2; Osmolarität: 300 mOsm	

DRG extrazelluläre Lösung (Patch-Clamp):

NaCl	131 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
KCl	2,5 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,25 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2 mM
Glucose	10 mM
pH 7,4 nach Begasung mit Carbogen (5 % CO <sub>2</sub> + 95 % O <sub>2</sub> ); Osmolarität: 300 mOsm (ohne Glucose)	

DRG extrazelluläre Lösung (TIRF):

NaCl	147 mM
KCl	2,4 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1,2 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
pH: 7,4; Osmolarität: 297 mOsm (ohne Glucose)	

DRG Stimulationslösung (60 mM Kalium):

NaCl	89,4 mM
KCl	60 mM
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1,2 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
pH: 7,3; Osmolarität: 305 mOsm (ohne Glucose)	

DRG-Zellkultur-Medium:

NBA-Medium	
FCS	5 %
FUDR	10 µl/ml

Forskolin (5 mM):

Forskolin (MW: 410,5 g/mol)	10 mg
DMSO	4,9 ml

FUDR:

FUDR	8,1 mM
Uridin	20,5 mM
DMEM	

H-89 (100 µM):

H-89 (MW: 519,28 g/mol)	1 mg
H <sub>2</sub> O	19,3 ml

HEK-Zellkultur-Medium (mit bzw. ohne Antibiotikum):

DMEM + 4,5 g/l Glutamax	500 ml
Sodiumpyruvat	5 ml
NEAA	5 ml
FCS	50 ml
(Penicillin/Streptomycin	0,5 ml)

Lysogeny Broth (LB)-Medium:

Pepton	8 g
Hefeextrakt	4 g
NaCl	4 g
H <sub>2</sub> O	800 ml

LB-Plattenmedium:

Pepton	4 g
Hefeextrakt	2 g
NaCl	2 g
Bacto-Agar	6 g
H <sub>2</sub> O	400 ml
Ampicillin	400 µl

Ladepuffer:

Sucrose	4 g
H <sub>2</sub> O (Sigma)	10 ml
Bromphenolblau	Spatelspitze

Locke's Lösung (10x) pH 6,8

NaCl	1,54 M
KCl	56 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	8,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	21,5 mM
D-Glucose H <sub>2</sub> O	100 mM

Mounting Medium:

Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerol	6 g
H <sub>2</sub> Odd	6 ml
0,2 M Tris-Puffer pH 8,5	12 ml

Neurobasal A (NBA)-Medium (mit bzw. ohne Antibiotika):

Neurobasal A	500 ml
B27	10 ml
Glutamax-Stock	5 ml
(Penicillin/Streptomycin	1 ml)

NPY (1 µM):

NPY peptide	4,26 µl
DRG extrazelluläre Lösung	1 ml

Optimem:

Optimem	44 ml
Tryptosephosphat	5 ml
HEPES Puffer	1 ml
Penicillin/Streptomycin	50 µl
BSA	0,1 g

Paraformaldehyd 4 % (Aliquots)

Formaldehyd (16 %)	10 ml
10x DPBS	4 ml
H <sub>2</sub> O (Sigma)	26 ml

PCR-Marker

Puffer 2	10 µl
pUC-19 (Plasmid)	42 µg
MspI	200 U
Wasser	ad 100 µl
Restriktionsverdau über Nacht bei 37 °C	



Penicillin/Streptomycin:

Penicillin	10.000 U/ml
Streptomycin	10 mg/ml

Permeabilisierungslösung:

Triton X-100	0,1 %
NGS	5 %
in Tris-NaCl	

Poly-D-Lysin (PDL):

Poly-D-Lysin Hydrobromid	0,5 mg/ml
Wasser (Sigma)	

Quenching-Lösung

Glycin	50 mM
Tris-NaCl	

Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium:

RPMI	500 ml
FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5,5 ml
HEPES	5,5 ml

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50x):

Tris Base	242 g
Eisessig	57,1 g
0,5 M EDTA	100 ml

Tris-NaCl (0,1 M pH 7,5):

Trishydrochlorid	100 mM
NaCl	150 mM
in H <sub>2</sub> O dest.	

Verdaulösung (steril filtriert):

Liberase (DH)	2,31 U
add 1 ml NBA-Medium	

### 2.1.4. Antikörper

#### Primäre Antikörper:

CREB (#86B10) Mouse mAb	Cell Signaling Technologies
Phospho-CREB (Ser133) (#87G3) Rabbit mAb	Cell Signaling Technologies

#### Sekundäre Antikörper:

Alexa 568 goat anti mouse	Life Technologies
Alexa 647 goat anti rabbit	Life Technologies

### 2.1.5. Primer

#### Genotypisierungsprimer (Alle von MWG Eurofin):

Forward Primer common (oIMR6223): 5'-TAT GTG GAC GGG GCA GAA GAT CCA GG-3'

Reverse Primer wildtyp (oIMR6224): 5'-CCC AGC TCA CAT ATT TAT CTA GAG-3'

Reverse Primer hrGFP (oIMR225): 5'-GGT GCG GTT GCC GTA CTG GA-3'

#### Klonierungsprimer: (NPY-Venus)

Forward Primer NPY-Venus (Life Technologies):

5'-TAT ATA GGT CTC GGA TCC ACC ATG CTA GGT AAC AAG-3'

Reverse Primer NPY-Venus (MPI Göttingen, AGCTLab):

5'-TAT AGC TAG CTT ACT TGT ACA GCT CGT CCA TG-3'

### 2.1.6. Bakterienstamm

DH5 $\alpha$ : F-  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44  
thi-1 gyrA96 relA1  $\lambda$ - (Life Technologies)

### 2.1.7. Viren

Lenti (pRRL.sin.cPPT.CMV.WPRE lentiviral transfer vector) NPY-Venus (Life Technologies)

### 2.1.8. Mauslinien

B6.FVB-Tg(Npy-hrGFP)1Lowl/J (Stock Nummer: 006417; The Jackson Laboratory)  
 C57BL/6J (Stock Nummer: 000664; The Jackson Laboratory)

### 2.1.9. Zelllinie

HEK293FT (Life Technologies)

### 2.1.10. Kits

Kit	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
EndoFree Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix	Life Technologies

### 2.1.11. Geräte

Gerät	Hersteller
Feinwaage (BP 1215)	Sartorius
Osmometer	Wescor
pH-Meter	Schott
Photometer (Bio Photometer)	Eppendorf
Power Supply (Power Pac 300)	Roth
Zeiss LSM 780	Zeiss
Thermocycler (Master Cycler gradient/personal)	Eppendorf
Thermomixer (comfort)	Eppendorf
UV-Tisch (FT-14/312)	Fisher Scientific

Gerät	Hersteller
Waage (BP 4100S)	Sartorius
Zentrifugen (5415 R/D)	Eppendorf

### 2.1.12. Setup und Zubehör

Gerät/Produkt	Hersteller
AOTF	A-A Opto-Electronic
Durchflusserhitzer (Eight Line In-Line Solution Heater (SHM-828) und CL-100 Bipolar Temperature Controller)	Warner Instruments
EPC9	HEKA
Filterblöcke	AHF-Analysentechnik AG
Glas-Kapillaren	Science Products
Kamera (QuantEM 512SC) (TIRF-Setup)	Photometrics
Kamera (Patch-Clamp-Setup)	Matsumoto
Ar-Laser (450, 488, 514 nm)	Spectraphysics
Microforge (MF 200)	WPI
Mikromanipulator	Physik-Instrumente GmbH
Mikroskop (IX 70) (invertiert)	Olympus
Mikroskop (Axioskop)	Zeiss
Monochromator (Visichrom)	Visitron Systems
Puller (P-97)	Sutter Instrument Co.
Stimulationsgeber (Isolated Pulse Stimulator Model 2100)	A-M Systems

### 2.1.13. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-Well-Platten	Becton Dickinson (BD)
Kryoröhrchen Nalgene (2 ml)	Fisher Scientific
Deckgläser (25 mm)	Stoss-Medica
Objektträger	Roth
Pasteurpipetten (Plastik, 5 ml)	Ratiolab

Produkt	Hersteller
PCR-Gefäße (4er Strips)	Sarstedt
Petrischale (Ø 35 mm)	BD
Petrischale (Ø 92 mm, 150 mm)	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µl)	Abimed
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Stabpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD
Zellkultur Flaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Fisher Scientific
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen (Amicon Ultra 100K UFC810024)	Merck Millipore

#### 2.1.14. Software

Software	Hersteller
A plasmid Editor (ApE; Freeware)	M. Wayne Davis
Chromas Lite	Technelysium Pty Ltd
Igor	Wavemetrics
Image J	NIH (USA)
Metamorph	Visitron
Office	Microsoft
Pulse	HEKA
Python Based Relational Animal Tracking (PyRAT)	Scionics Computer Innovation
Zen 2012	Zeiss

Firmensitze:

**A-A Opto-Electronic:** Orsay, F ; **Abcam:** Cambridge; UK; **Abimed:** Langenfeld, DEU; **AHF-Analysentechnik AG:** Tübingen, DEU; **A-M Systems,** Sequim, WA, USA; **Becton Dickinson (BD):** Heidelberg, DEU; **Biozym:** Hessisch Oldendorf, DEU; **Calbiochem:** Mannheim, DEU; **Cell Signaling Technologies:** Danvers, MA, USA; **Eppendorf:** Hamburg, DEU; **Fermentas:** St. Leon-Rot, DEU; **Fisher Scientific:** Schwerte, DEU; **Greiner Bio-One:** Frickenhausen, DEU; **HEKA:** Lambrecht, DEU; **The Jackson Laboratories:** Bar Harbor, Maine, USA; **Life Technologies:** Darmstadt, DEU; **Matsumoto:** , ; **Merck:** Mannheim, DEU; **Merck Millipore:** Darmstadt, DEU; **Microsoft:** Berlin, DEU; **MPI AGCTLab:** Göttingen, DEU; **MWG Eurofin:** Heidelberg, DEU; **New England Biolabs NEB:** Frankfurt/M., DEU; **Olympus:** Hamburg, DEU; **Panbiotech:** Aidenbach, DEU; **Photometrics:** Tucson, AZ, USA; **Physik-Instrumente GmbH:** Karlsruhe, DEU; **Polyscience:** Eppelheim, DEU; **QIAGEN:** Hilden, DEU; **Ratiolab:** Dreieich, DEU; **Roche:** Grenzach-Wyhlen, DEU; **Roth:** Karlsruhe, DEU; **Sarstedt:** Nümbrecht, DEU; **Sartorius:** Göttingen, DEU; **Schott:** Mainz, DEU; **Science Products:** Hofheim, DEU; **Scionics Computer Innovation:** Dresden, DEU; **Sigma-Aldrich:** Steinheim, DEU; **Spectraphysics:** Darmstadt, DEU; **STOSS-MEDICA Medizintechnik GmbH:** Friedrichsthal, DEU; **Sutter Instrument Co.:** Novato, CA, USA; **Technelysium Pty Ltd:** South Brisbane, AUS; **Thermo Fisher Scientific:** Schwerte, DEU; **Visitron Systems:** Puchheim, DEU; **Warner Instruments:** Hamden, CT, USA; **Wavemetrics:** Lake Oswego, OR, USA; **Wescor:** Logan, UT, USA; **World Precision Instruments WPI:** Berlin, DEU; **Zeiss:** Jena, DEU

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Maushaltung und Genotypisierung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden hemizygote B6.FVB-Tg(Npy-hrGFP)<sup>1</sup>Lowl/J- (im Folgenden nur Npy-hrGFP) (The Jackson Laboratory) Mäuse, im Alter zwischen 2 bis 5 Wochen genutzt. Diese Mäuse exprimieren unter dem Promotor von NPY das Fluoreszenzprotein humanized *Renilla* Green Fluorescent Protein (hrGFP). Dies bedeutet, dass Zellen, die in Wildtyp-Mäusen endogen NPY exprimieren, in der Npy-hrGFP Maus grün fluoreszieren, wenn sie mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden. Diese Mäuse wurden ausgewählt, um einen Selektionsmarker für DRG-Neurone zu haben, da nur ein bestimmter Anteil der Neurone endogen NPY exprimiert. Dieser Knockout von NPY führt zu keinem offensichtlichen Phänotyp in heterozygoten Mäusen (Lowell, 2007). Die Mäuse wurden unter reinen Bedingungen nach geltendem Tierschutzgesetz in einer offenen Käfighaltung und bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h gehalten (Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes).

Bei der Zucht der Mäuse wurden nur Nachkommen gezeugt, die entweder einen Wildtyp (wt)- oder heterozygoten wt/hrGFP (+/-) Genotyp aufwiesen, da über homozygote hrGFP/hrGFP Tiere zu etwaigen Phänotypen keine Informationen vorhanden waren. Es wurden Wildtyp (wt)-Weibchen mit hemizygoten (+/-) Männchen verpaart. Um den Genotyp der gezüchteten Tiere zu bestimmen, wurden Jungtieren im Alter zwischen 2 und 3 Wochen, mithilfe einer Ohrlochzange Ohrmarkierungen gesetzt. Aus den so gewonnenen Gewebestücken wurde, durch einen Enzymverdau mit dem Quick Extrakt-Reagenz, die DNA der Tiere isoliert. Jedem Gewebestück wurden 50 µl Quick Extrakt zugegeben und die Reaktionsgefäße 6 min bei 65 °C und 1400 rpm in einem Eppendorf Thermomixer geschüttelt. Zum Abstoppen dieses Enzymverdaus wurde die Temperatur des Thermomixers auf 95 °C erhöht und die Lysate weitere 13 min bei 600 rpm geschüttelt. Die aus den Lysaten freigesetzte DNA wurde nach folgendem Protokoll für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt:

### Reaktionsansatz pro Probe:

10 pmol Primer forward common (oIMR6223)  
 20 pmol Primer reverse wildtyp (oIMR6224)  
 10 pmol Primer reverse hrGFP (oIMR6225)  
 5 mM dNTP-Mix  
 2 µl 10x PCR-Puffer  
 1 U REDTaq DNA Polymerase  
 1 µl DNA  
 ad 20 µl HPLC H<sub>2</sub>O

### PCR-Programm:

94 °C 3 min  
 94 °C 0,5 min  
 55 °C 0,5 min  
 72 °C 1 min  
 72 °C 2 min  
 Halten bei 10 °C

} x 35

Die Proben wurden nach der PCR neben einem PCR-Marker auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und 45 min bei 80 V aufgetrennt. Bei der Dokumentation der Gele sollte bei wt Tieren eine DNA-Bande bei 500 bp zu sehen sein, bei +/- Tieren wurde bei einer Größe von 400 bp eine zusätzliche zweite Bande erwartet.

## **2.2.2. DRG-Neuronen-Präparation**

Vor der eigentlichen Präparation der Neurone mussten Deckgläser, auf die die Neurone später ausgesät werden sollten, vorbereitet werden. Hierzu wurden acht 25 mm Deckgläser in je ein Well einer 6-Well-Platte gelegt. Damit die Neurone besser auf den Deckgläsern anhaften konnten, wurden die Deckgläser mit je 200 µl Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet und die Platten anschließend über Nacht in einen Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) gestellt. Am nächsten Tag wurde das PDL abgenommen und die Deckgläser mit 250 µl Wasser (Sigma) gewaschen, bevor sie mit den Platten für 20 min zum Sterilisieren unter UV-Licht gestellt wurden. Nach der UV-Bestrahlung wurden die Deckgläser ein weiteres Mal mit 250 µl Wasser und 2-mal mit je 500 µl NBA-Medium gewaschen. Nachdem das NBA-Medium vollständig abgenommen worden war, wurden in jedes Well 2 ml DRG-Zellkultur-Medium (siehe 2.1.3 Lösungen) gegeben und die Platten bis zur weiteren Benutzung im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) aufbewahrt.

Zur Präparation der DRG-Neurone wurden 2 bis 5 Wochen alte +/- Npy-hrGFP Mäuse genutzt. Zunächst wurden die Tiere in einer Kammer, in die langsam CO<sub>2</sub> einströmte, getötet und anschließend dekapitiert. Zur Desinfektion wurden die Mäuse vor dem Transfer unter eine sterile Werkbank mit Ethanol besprüht. Unter der Werkbank wurden das Rückenfell der Tiere

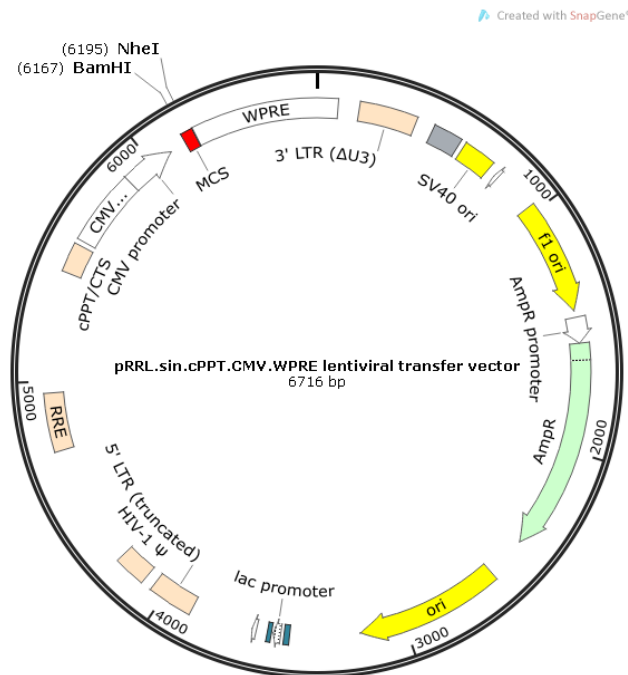


und das Gewebe entlang der Wirbelsäule vorsichtig mit entsprechenden Scheren entfernt. Im nächsten Schritt wurde die Wirbelsäule in Höhe der Hinterbeine transversal durchtrennt. Mit einer feinen Knochenschere bekam man Zugang zum Wirbelkanal und konnte eine Schneide der Schere dort einführen, um die dorsale Hälfte der Wirbelsäule zu entfernen. Das so freigelegte Rückenmark wurde vorsichtig entnommen und verworfen. Die in den Zwischenwirbellöchern gelegenen Hinterwurzel-Ganglien (DRGs) konnten nun vorsichtig entnommen werden. Bereits entnommene DRGs wurden bis zum Ende der Präparation in einem Tropfen Locke's Lösung (siehe 2.1.3 Lösungen) in einer Petrischale aufbewahrt. Um die Neurone aus den Ganglien freizusetzen, wurden die Ganglien in eine frisch zubereitete und sterilfiltrierte Verdauungslösung (siehe 2.1.3 Lösungen) überführt und in dieser unter Schütteln für 5 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ganglien sehr vorsichtig mit einer 1 ml Eppendorf Pipette 10- bis 15-mal trituriert und danach für weitere 5 min im Wasserbad inkubiert. Nun folgte eine erneute Trituration. Nach erneuten 5 bis 7 min im Wasserbad wurde der Enzymverdau durch Zugabe von 100 µl FCS abgestoppt. Da FCS durch seinen hohen Proteinanteil das aktive Zentrum des Enzyms Collagenase besetzt, wird das Gewebe nicht weiter verdaut. Die Zellen wurden als Nächstes 4 min bei 300 rcf zentrifugiert, der Überstand verworfen und durch 1 ml DPBS ersetzt. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt für 5 min bei 300 rcf wurde auch das DPBS verworfen und durch 800 µl DRG-Zellkultur-Medium ersetzt. 100 µl dieser Zellsuspension wurden im letzten Schritt in je ein Well der zuvor vorbereiteten 6-Well Platten ausgesät. Bis zum nächsten Tag wurden die Zellen im Inkubator aufbewahrt. Am Tag nach der Präparation wurde das Medium abgenommen und, je nach Weiterverwendung der Zellen, durch frisches DRG-Zellkultur-Medium mit oder ohne Antibiotika ersetzt. Bis zur Durchführung von Experimenten wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Inkubator gehalten. Da es sich bei dieser Art Zellkultur um eine Primärzellkultur handelte und so gewonnene Zellen außerhalb des Spenderorganismus nur eine gewisse Zeit überleben, wurden elektrophysiologische Experimente 1-2 Tage und Mikroskopie-basierte Experimente in einem Zeitraum von 6-14 Tagen nach Präparation durchgeführt.

### **2.2.3. Herstellung eines NPY-Venus Lenti-Plasmids**

Zur Visualisierung elektronendichter Granula (LDCVs) mittels interner Totalreflexionsmikroskopie (TIRFM) in DRG-Neuronen wurde ein Plasmid kloniert, welches

für das Fusionsprotein NPY-Venus codiert. Als Vektor wurde der „pRRL.sin.cPPT.CMV.WPRE lentiviral transfer vector“ von Life Technologies benutzt.



**Abbildung 2 : Vektorkarte des „pRRL.sin.cPPT.CMV.WPRE lentiviral transfer vector“.** Diese Karte zeigt die wichtigsten Elemente des Vektors, wie die Multiple-Cloning-Site (MCS) mit den Schnittstellen, die zur Einklonierung von NPY-Venus genutzt wurden; die 3' und 5' LTRs, die das Virus benötigt, um seine DNA nach Infektion einer Wirtszelle durch homologe Rekombination in das Wirtsgenom einbauen zu können; den SV40 ori, der wichtig ist für die Replikation der Virus-DNA im Wirtsgenom, und die Ampicillin Resistenz (AmpR), die bei der Klonierung als Selektionsmarker für die entstandenen Klone dient. Des Weiteren enthält das Plasmid einen origin of replication (ori) für doppelsträngige Replikation und einen f1 ori für die Einzelstrang-Replikation, was das Plasmid zu einem sogenannten Phagemid macht. Der CMV-Promoter dient als starker Promoter für das später einklonierte DNA-Fragment.

Der in Abbildung 2 gezeigte Leervektor wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nhe*I an den eingezeichneten Stellen geschnitten, um das mit den gleichen Enzymen verdaute Insert dort einfügen zu können. Das Insert codierte für das Fusionsprotein NPY-Venus. NPY ist ein Peptid, das spezifisch in LDCVs transportiert und durch das pH-sensitive Fluoreszenzprotein Venus in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sichtbar wird. Dieses Insert wurde mittels PCR (Saiki et al., 1985) amplifiziert, wobei durch den Forward Primer 5'-TAT ATA GGT CTC **GGA TCC ACC ATG CTA GGT AAC AAG**-3' eine *Bsa*I-Schnittstelle und durch den Reverse Primer 5'-TAT **AGC TAG CTT ACT TGT ACA GCT CGT CCA TG**-3' eine *Nhe*I-Schnittstelle eingefügt wurden.

PCR-Ansatz:

2,5 pMol Forward Primer NPY-Venus *Bsal*  
 5 pMol Reverse Primer NPY-Venus *NheI*  
 10 mMol dNTP-Mix  
 10 ng DNA (pSFV\_NPY-Venus)  
 5 µl (10x) *pfu*-Polymerase-Puffer  
 2,5 U *pfu*-Polymerase  
 ad 50 µl HPLC-Wasser

PCR-Programm:

95 °C 3 min  
 95 °C 0,5 min  
 60 °C 0,5 min  
 75 °C 1 min  
 75 °C 2 min  
 Halten bei 4 °C

} x 35

Um das reine PCR-Produkt zu erhalten, wurde der PCR-Ansatz mit den Reagenzien und nach dem Protokoll des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Der Aufreinigung von DNA über spezielle Silika-Säulen liegt das Prinzip eines Anionen-Austauschers zugrunde. Im Anschluss an die Aufreinigung wurde das gesamte PCR-Produkt für einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bsal* und *NheI* verdaut. Bei einem Restriktionsverdau kann DNA durch Zugabe von Restriktionsendonukleasen an definierten Sequenzen geschnitten werden. Gleichzeitig wurde der Vektor mit den Enzymen *BamHI* und *NheI* verdaut.

Restriktionsansätze:**Lenti-Plasmid:**

3 µg Lenti-Leervektor  
 5 µl BSA  
 5 µl Puffer 2  
 10 U *BamHI*  
 10 U *NheI*  
 ad 50 µl HPLC Wasser  
 → 1,5 h bei 37 °C verdauen  
 → anschließend + 1 U SAP  
 → 1 h bei 37 °C  
 → 15 min bei 75 °C hitzeinaktivieren

**PCR NPY-Venus:**

49 µl PCR-Produkt NPY-Venus  
 6,5 µl BSA  
 6,5 µl Puffer 2  
 10 U *Bsal*  
 ad 65 µl HPLC Wasser  
 → 1 h bei 50 °C verdauen  
 → anschließend + 10 U *NheI*  
 → 1 h bei 37 °C verdauen

Die Zugabe von Shrimp Alkaliner Phosphatase (SAP) zu dem Ansatz des Plasmids bewirkt eine Dephosphorylierung des 5'-Endes des linearisierten Vektors und verhindert somit

dessen Religation. Nach den Restriktionsreaktionen wurden beide Ansätze jeweils mit Ladepuffer versetzt, neben einem  $\lambda$ -Marker auf ein 1%iges präparatives Agarosegel aufgetragen und 45 min bei 80 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden der gewünschten Basenpaar-Länge unter UV-Licht ausgeschnitten. Die so erhaltenen Gelstücke wurden nach dem Protokoll und mit den Reagenzien des QIAquick Gel Extraction Kits behandelt (Prinzip der Isolation von DNA aus Agarosegelen siehe Vogelstein und Gillespie (1979)). Zur Überprüfung, ob die Aufreinigung erfolgreich war und ob die richtigen DNA-Fragmente isoliert wurden, wurden je 2,5  $\mu$ l der DNA mit 2,5  $\mu$ l HPLC Wasser und 1  $\mu$ l Ladepuffer versetzt, erneut neben einem  $\lambda$ -Marker auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und 45 min bei 80 V aufgetrennt.

Um nun das geschnittene PCR-Produkt in den geschnittenen Vektor zu klonieren, wurden 10 ng des Vektors mit 4,5 ng Insert versetzt und zusammen mit T4 DNA Ligase inkubiert.

Die Mengen ergaben sich aus folgender Rechnung:

$$\frac{10 \text{ ng Vektor}}{6700 \text{ bp Insert}} * 1000 \text{ bp Insert} * 3 = 4,5 \text{ ng Insert}$$

#### Ligationsansatz:

2  $\mu$ l 10x T4 DNA Ligase Puffer

10 ng Lenti-Leervektor

4,5 ng NPY-Venus PCR-Produkt

2 U T4 DNA Ligase

ad 20  $\mu$ l HPLC Wasser

Als Kontrolle einer eventuellen Religation des Vektors gab es einen zweiten Ansatz, in dem die Menge an PCR-Produkt durch das entsprechende Volumen Wasser ersetzt wurde. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Für eine Hitzeschock-Transformation wurden den Ansätzen am nächsten Tag je 100  $\mu$ l kompetente DH5 $\alpha$  (*E. coli*- Stamm)-Zellen zugegeben, die Zellsuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen wieder für 10 Minuten auf Eis gestellt und schließlich 300  $\mu$ l LB-Medium (siehe 2.1.3 Lösungen) zugegeben. Diese Zellsuspension wurde auf Agar-Ampicillin (Resistenzgen des Plasmids)-Platten ausplattiert, sodass nur Klone wachsen konnten, die das korrekte Plasmid aufgenommen und amplifiziert hatten. Die

Platten wurden über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die auf den Platten gewachsenen Kolonien in jeweils 2 ml LB-Medium (+ 1 µl Ampicillin/ml LB-Medium) überimpft werden. Diese Flüssigkulturen wurden bei 37 °C unter Schütteln so lange inkubiert, bis eine deutliche Trübung des Mediums, also ein Wachstum der Bakterien, zu erkennen war. In der Regel betrug diese Zeitspanne etwa 16 h. Nach dieser Zeit wurden die Bakterien geerntet und nach dem Protokoll des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) behandelt. Die Sequenzierung der so erhaltenen DNA-Proben wurde von der Firma MWG Eurofins durchgeführt. Die Sequenzierungsmethode beruht auf der Kettenabbruchssequenzierung nach Frederick Sanger (Sanger et al., 1977). Die von MWG übermittelten Sequenzen wurden mit den Programmen Chromas und ApE auf Richtigkeit untersucht. Da alle eingeschickten Sequenzen korrekt waren, wurde die DNA eines der Klone ausgewählt und erneut in DH5α-Zellen transformiert, um größere Mengen DNA zu produzieren. Die gewachsenen Kolonien wurden hierzu in 250 ml LB-Medium angeimpft und nach einer Über-Nacht-Inkubation mit den Reagenzien und nach dem Protokoll des EndoFree Plasmid Maxi Kits behandelt.

#### **2.2.4. Virus-Produktion**

Aus dem in Abschnitt 2.2.3 erhaltenen Lenti-Virus-Plasmid wurde im nächsten Schritt das entsprechende Virus hergestellt. Das Lenti-Virus wurde zur Transduktion der DRG-Neurone ausgewählt, da es im Vergleich zum Semliki Forest-Virus mit dem Metabolismus der Neurone wesentlich weniger interferiert, die Transduktion schonender und die Zeitspanne, in der Experimente mit den Zellen durchgeführt werden können, erheblich größer ist. Zur Produktion des Virus wurde der ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix benutzt.

Zur Produktion des Lenti-Virus benötigt man eine spezielle Form der Zelllinie HEK 293, HEK293FT. Diese Form der „Human Embryonic Kidney“-Zelllinie wurde mit dem SV40 großen T Antigen transformiert und kann, sofern der zu transformierende Vektor einen SV40 origin besitzt, in Kombination mit dem ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix große Mengen des gewünschten Virus produzieren. Weitere Vorteile der HEK293FT-Linie sind ihr schnelles Wachstum und die gute Transfizierbarkeit.

Die HEK293FT-Zellen wurden an Tag 1 der Virus-Produktion 30 % konfluent auf eine Ø 150 mm Petrischale in 30 ml HEK-Zellkultur-Medium (siehe 2.1.3 Lösungen) ohne

Antibiotika ausgesät. An Tag 2 wurden zunächst 20 ml Optimem Medium (Life Technologies) steril filtriert und zwei 15 ml Falcons vorbereitet. In eines der Falcons wurden 3 ml Optimem vorgelegt, dann 18 µl des Lentiviral Packaging Mix und ca. 20 µg DNA (pLenti\_NPY-Venus) zugegeben. In dem zweiten Falcon wurden 3 ml Optimem mit 60 µl Lipofectamin 2000 für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Inhalt beider Falcons vereinigt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium auf den HEK293FT-Zellen abgenommen und sie wurden mit ca. 10 ml Optimem gespült. Hierbei war darauf zu achten, dass sich die Zellen bei diesem Waschschrift nicht vom Untergrund ablösen. Nach der 20-minütigen Inkubation wurde das Optimem wieder von den Zellen abgenommen und das inkubierte Plasmid-Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben. Um den Zellen genügend Nährstoffe für ihr Wachstum zur Verfügung zu stellen, wurde zusätzlich zu der Plasmid-Mischung noch das restliche Optimem auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden ca. 20 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator aufbewahrt. Am dritten Tag wurde das Medium über den Zellen abgenommen und durch 30 ml HEK-Zellkultur-Medium ohne Antibiotika ersetzt. Die Zellen wurden dann bis Tag drei nach Transfektion im Inkubator aufbewahrt. An Tag drei nach Transfektion der HEK293FT-Zellen wurde eine auf 4 °C vorgekühlte Zentrifuge, zwei 50 ml Falcons, ein 15 ml Falcon, ein Amicon Ultra 100K UFC810024 Zentrifugenröhrchen und einige Kryoröhrchen benötigt. Das produzierte Virus fällt unter die Sicherheitsstufe S2, die dadurch zustande kommt, dass es sich bei dem Virus um ein auf dem Retrovirus HIV-I basierendes Virus handelt. Dieses Virus wurde allerdings so modifiziert, dass es replikationsinkompetent ist. Dies wird gewährleistet, indem die Gene *gag* (capsid), *pol* (reverse transkriptase) und *env* (envelope), die für Enzyme, Kapsid- oder Membranproteine codieren und zur Replikation des Virus benötigt werden, auf gesonderte Plasmide verteilt werden (Helferplasmide). So kann das Virus zwar, einmal vollständig zusammengebaut, einmalig Zellen infizieren, ihre DNA, die rekombinant in die DNA der Wirtszelle eingebaut wird, codiert aber nur noch für die zuvor in den Lenti-Vektor einklonierte DNA (in diesem Fall für NPY-Venus), nicht jedoch für die Gene der Strukturproteine des Virus. Auch wurde darauf geachtet, dass das Haupt- und die Helferplasmide keine homologen Regionen besitzen, sodass es nicht zu Rekombinationen kommen kann und die Viren versehentlich ihre Replikationskompetenz wiedererlangen (Dull et al., 1998). Weiterhin besitzt der Lenti-Vektor eine Deletion in den 3'-LTR, die nach Transduktion durch das Virus zu dessen Selbst-Inaktivierung führt (Yee et al., 1987; Yu et al.,

1986; Zufferey et al., 1998). Trotz dieser Sicherheitsmerkmale des Virus mussten entsprechende Sicherheitsvorschriften beachtet werden.

HEK-Zellen werden durch die Virus-Produktion stark geschädigt, sodass das fertige von ihnen produzierte Virus in den Überstand freigesetzt wird. Dieser wurde deshalb in eines der 50 ml Falcons überführt und bei 4 °C und 3000 rcf für 20 min zentrifugiert. Hierdurch wurden tote und abgelöste Zellen pelletiert und das reine Medium konnte in ein zweites 50 ml Falcon abgegossen werden. Um nun das Virus aufzureinigen und aufzukonzentrieren, wurden ca. 4 ml des Mediums in ein Amicon Zentrifugenröhrchen gegeben, welches dann bei 4 °C und 2000 rcf für 15 min zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde in eine 20%ige SDS-Lösung verworfen, 600 µl der auf dem Filter verbleibenden Virus-Lösung in ein 15 ml Falcon auf Eis überführt und das Zentrifugenröhrchen mit dem Überstand der Zellen wieder aufgefüllt. Diese Prozedur wurde mit der gesamten Virus-Lösung durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das gesamte auf dem Filter verbliebene Medium in das 15 ml Falcon überführt. Das nun aufkonzentrierte Virus wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bis zur Benutzung bei -80 °C gelagert. Ein Titer-Test wurde mit dem Virus nicht durchgeführt. Zum einen ist die Menge an gewonnenem Virus sehr gering und man würde während eines Titer-Tests zu viel Virus verlieren. Zum anderen konnte die Qualität des Virus bereits kurz vor der Ernte gut am Aussehen der HEK-Zellen und an der Fluoreszenzintensität bei Beleuchtung mit Licht der Wellenlänge 488 nm abgeschätzt und dementsprechend das einzusetzende Volumen an Virus bei einer späteren Transduktion angepasst werden.

### **2.2.5. Transduktion**

Zur Visualisierung von LDCVs in DRG-Neuronen wurden die Neurone mit dem NPY-Venus Lenti-Virus transduziert. Bei der Transduktion infiziert ein Virus eine Wirtszelle, in diesem Fall DRG-Neurone, die RNA des Virus wird in der Zelle revers transkribiert, anschließend in den Kern transportiert (Lewis und Emerman, 1994; Naldini, 1999) und dort durch Rekombination in das Genom der Wirtszelle integriert (Buchsacher und Wong-Staal, 2000). Hierzu wurde einen Tag nach der Präparation der Neurone zunächst das DRG-Zellkultur-Medium durch frisches Medium ohne Antibiotika ersetzt. Dann wurden (in der Regel, je nach Qualität des Virus) 100 µl des Virus je Well auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium über den Zellen erneut abgenommen und durch DRG-

Zellkultur-Medium mit Antibiotika ersetzt. Die Zellen wurden 6-14 Tage nach Transduktion für fluoreszenzmikroskopische Experimente genutzt.

### 2.2.6. Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist es durch den Gebrauch entsprechender Farbstoffe beziehungsweise Fluoreszenzproteine möglich, sowohl dynamische Prozesse in lebenden Zellen als auch die Lokalisation von Proteinen in fixierten Zellen zu beobachten.

Hierzu muss zunächst ein Farbstoff/Fluoreszenzprotein in die zu untersuchende Zelle gebracht werden. Dies kann in lebenden Zellen aktiv, durch Transduktion mittels eines Virus, oder passiv, durch Diffusion eines Calciumindikators, geschehen. Möchte man sich die Lokalisation von Proteinen in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt anschauen, ist dies am besten möglich, indem man Zellen fixiert, sich durch Permeabilisierung Zugang zum Zellinneren verschafft und das zu untersuchende Protein mit einem primären Antikörper inkubiert, der möglichst spezifisch an das gewünschte Protein bindet. Die Lokalisation dieses primären Antikörpers wiederum wird durch Zugabe eines an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten und gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörpers bestimmt. Um die Farbstoffe bzw. Fluoreszenzproteine tatsächlich in den Zellen sichtbar zu machen, werden diese mit einer für sie spezifischen Wellenlänge des sichtbaren Lichts angeregt. Geschieht dies, wird die Energie des Lichtes von dem Protein bzw. dem Farbstoff absorbiert, wodurch Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden und beim Zurückfallen auf ihren Grundzustand Photonen einer längeren Wellenlänge als der des Anregungslichts emittieren. Die so erzeugte Fluoreszenz kann man sich schließlich mit geeigneten Mikroskopen ansehen. Man kann bei Fluoreszenzmikroskopie zwischen hochauflösender und gewöhnlicher Fluoreszenzmikroskopie unterscheiden. Gewöhnliche Fluoreszenzmikroskopie kommt heutzutage beispielsweise bei der Messung der Veränderung der globalen intrazellulären Calciumkonzentration zum Einsatz. Hierbei kann man nicht genau bestimmen, an welcher Stelle ein Ereignis stattfindet oder wie hoch die Konzentration von Calcium an einer bestimmten Stelle einer Zelle ist. In dieser Arbeit wurde die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation der DRG-Neurone mit dem Calciumindikator Fura-2 AM untersucht. Obwohl Laser Scan Mikroskopie (LSM) nicht zu den hochauflösenden Mikroskopiearten gehört, kann man mit ihrer Hilfe aufgrund



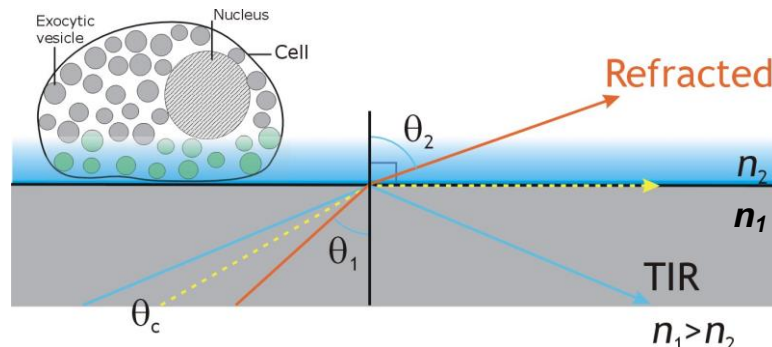
des sehr hohen Signal-Rausch-Verhältnisses detaillierte Bilder generieren. Sie wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung von Proteinen in fixierten DRG-Neuronen eingesetzt. Zu den hochauflösenden Mikroskopiearten gehört beispielsweise die Interne-Totalreflexionsfluoreszenz-Mikroskopie (TIRFM). Mit dieser kann man kleinste Strukturen und deren Lokalisation in der Zelle sichtbar machen. Mittels TIRFM wurde in dieser Arbeit die Fusion von LDCVs in lebenden DRG-Neuronen beobachtet.

#### **2.2.6.1. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) und Stimulation der LDCV-Sekretion**

TIRFM zählt zu den hochauflösenden Mikroskopie-Techniken. Sie ermöglicht es, Prozesse die nahe an der Zellmembran stattfinden, zu beobachten. In dieser Arbeit wurde TIRFM dazu genutzt, um die Fusion von LDCVs am Zellkörper von DRG-Neuronen auf einen Stimulus hin zu untersuchen. Hierzu wurden DRG-Neurone mit einem Lenti-Virus transduziert, das für das Fusionsprotein NPY-Venus codierte. NPY ist ein Neuropeptid, das spezifisch in LDCVs transportiert wird. Venus ist ein pH-sensitives Fluoreszenzprotein, das sein Anregungsmaximum bei 514 nm und sein Emissionsmaximum bei 528 nm hat. Durch seine pH-Sensitivität ist es besonders gut geeignet, Exozytose von Vesikeln zu beobachten. Im sauren Milieu (pH 5,5) der LDCVs ist der Farbstoff bei Anregung mit 514 nm zwar sichtbar, seine Emission aber gedämpft. Fusioniert ein LDCV mit der Plasmamembran der Zelle, kommt das Innere des LDCVs mit dem neutralen pH (pH 7,4) des Extrazellulärmediums in Kontakt und die Leuchtintensität des Farbstoffes wird stärker. Fusionsereignisse können also dadurch identifiziert werden, dass ein LDCV schnell und kurz hell aufleuchtet und danach wieder seine Ausgangsfluoreszenz annimmt, wenn es nur teilweise mit der Plasmamembran fusioniert („Kiss and Run“ bzw. „Kiss and Stay“) beziehungsweise kurz aufleuchtet und dann schnell seine Fluoreszenz verliert, wenn die Vesikelmembran komplett mit der Plasmamembran verschmilzt („Full Fusion“).

Das hochauflösende Prinzip bei TIRFM liegt darin, dass nur die Ebene, mit der die Zelle auf dem Deckglas anhaftet, beleuchtet wird (Axelrod, 1981). Indem der Rest der Zelle nicht beleuchtet wird, wird das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, da es kein Streulicht von Objekten im Hintergrund gibt. Die definierte Beleuchtung der Zelle wird dadurch erreicht, dass man sich die Gesetze der Lichtbrechung zunutze macht. Trifft Licht nacheinander auf

Medien mit kleiner werdenden Brechungsindizes  $n_1 > n_2$ , wie beispielsweise Glas (Deckglas) und wässrige Lösung (Extrazellulärmedium), wird es ab dem kritischen Einfallswinkel  $\theta_c$  vollständig reflektiert. Dennoch kann ein Anteil des Lichts als elektromagnetische Strahlung, der sogenannten evaneszenten Welle, in das zweite Medium übergehen und so Fluoreszenzproteine/-Farbstoffe in einem Abstand von ca. 200 nm zum ersten Medium anregen (Axelrod, 2001) (Abbildung 3).

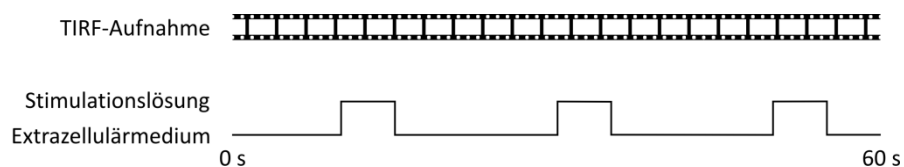


**Abbildung 3 : Schematische Darstellung von TIRFM (modifiziert nach (Steyer und Almers, 2001)).** Geht Licht mit einem Winkel  $\theta_1$  von einem Medium ( $n_1$ ) in ein zweites Medium mit einem kleineren Brechungsindex ( $n_2$ ) als dem des ersten Mediums über, so wird das Licht im Winkel  $\theta_2$  gebrochen. Vergrößert man den Winkel  $\theta_1$ , erreicht man irgendwann einen kritischen Winkel  $\theta_c$ , in dem das Licht am Übergang der beiden Medien total reflektiert wird. Trotz Totalreflexion gelangt ein kleiner Teil des Lichts als elektromagnetische Strahlung, der sogenannten evaneszenten Welle, in das zweite Medium und kann dort fluoreszente Moleküle anregen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit dieser Methode LDCVs bzw. deren Sekretion am Zellkörper von DRG-Neuronen beobachtet. Hierzu wurden die auf den Deckgläsern angewachsenen DRG-Neurone (siehe Teil 2.2.2 DRG-Neuronen-Präparation) mit dem Deckglas in eine genau passende Halterung fest eingeschraubt. So wurde vermieden, dass während Messungen mit TIRFM ein Drift des Deckglases und somit des fokussierten Bereiches stattfinden kann. Die Zellen wurden mit Extrazellulärmedium bedeckt und die Halterung wurde in eine Platte am TIRFM-Messstand über einem 100x TIRF-Ölimmersionsobjektiv (100x/1,45NA-Plan apochromatischen Objektiv (Olympus)) eingelegt. Zuvor wurde ein kleiner Tropfen Immersions-Öl auf das Objektiv gegeben. Das Öl bewirkt, dass die numerische Apertur des Objektives von 1,45 erreicht wird und dass keine Lichtbrechung zwischen der Linse des Objektives und dem Deckglas stattfindet, da das Öl den gleichen Brechungsindex besitzt wie Glas. Bei dem verwendeten Mikroskop handelte es sich um ein inverses IX70 Mikroskop der Firma Olympus. Durch einen Argon-Laser (Spectraphysics) und einen Acousto Optic Tunable Filter (AOTF) wurden die Zellen mit Licht

einer Wellenlänge von 514 nm angeregt. Der Winkel, mit dem das Laserlicht auf die Zellen traf, wurde so eingestellt, dass Totalreflexion stattfand. Das Fluoreszenzsignal wurde über eine CCD-Kamera (QuantEM 512SC (Photometrics)) zu einem Computer weitergeleitet und konnte dort mithilfe der Software Metamorph beobachtet und gespeichert werden (Becherer et al., 2007). Die Belichtungszeit während der TIRFM-Aufnahmen wurde über Metamorph gesteuert und betrug 100 ms. Die Aufnahmefrequenz der TIRFM-Filme betrug 10 Hz. Die Zellen wurden während aller Experimente mit TIRFM ständig mit frischem Extrazellulärmedium, das mithilfe eines Durchflusserhitzers auf ca. 32 °C erwärmt wurde, umspült.

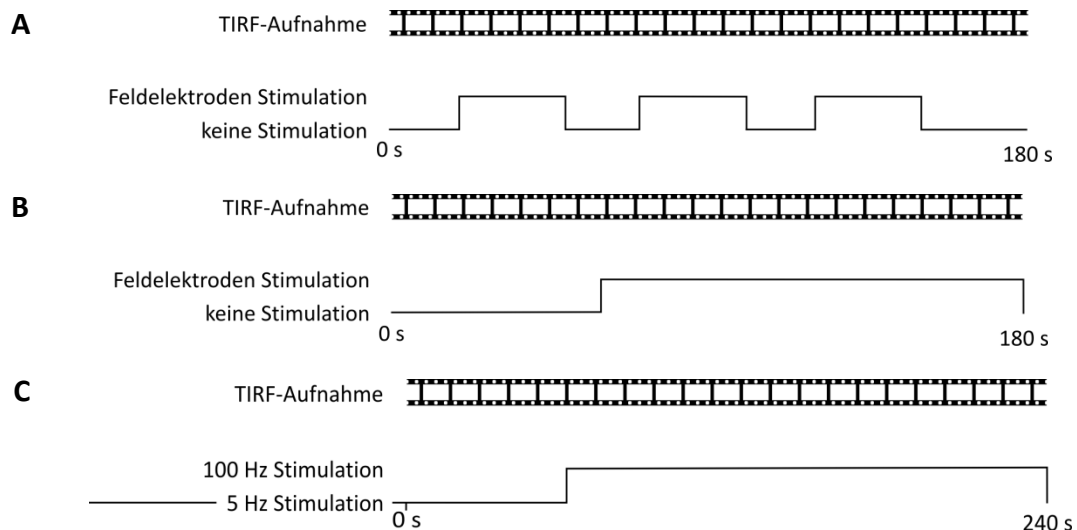
Da DRG-Neurone selten spontan, sprich ohne Stimulation, LDCVs freisetzen, wurden die Zellen mit verschiedenen Methoden zur Sekretion stimuliert. Zum einen wurden Zellen mithilfe einer Stimulationslösung (siehe 2.1.3 Lösungen) mit 60 mM Kalium, die sie auf etwa 0 mV depolarisiert, stimuliert. Dies geschah 3-mal konsekutiv für je 5 Sekunden während der gleichzeitigen Aufnahme 1-minütiger TIRFM-Filme. Stimuliert wurde 10, 30 und 50 s nach Beginn der Aufnahme. Hierzu wurde eine Applikationsperfusion in die Nähe der zu untersuchenden Zelle gebracht und die Stimulationslösung, gesteuert durch einen elektrischen Schalter, zu definierten Zeitpunkten in sehr geringen Mengen appliziert (Abbildung 4).



**Abbildung 4 : Schematische Darstellung der Stimulation von DRG-Neuronen durch Applikation einer 60 mM KCl-Lösung.** Während der 1-minütigen TIRFM-Filmaufnahme wurde nach 10, 30 und 50 s für jeweils 5 s 60 mM Kaliumlösung appliziert.

Eine andere Möglichkeit zur Stimulation der Neurone, ist die elektrische Stimulation. Diese wurde in dieser Arbeit mithilfe einer Feldelektrode durchgeführt. Bei dem Aufbau wurde eine Referenzelektrode, die aus einem Silberdraht bestand, mit einem zweiten Silberdraht, der Stimulationselektrode, verbunden. Diese wurde, um das elektrische Feld besser begrenzen und kontrollieren zu können, in eine sich zur Öffnung hin verjüngende Glaskapillare eingefädelt, welche ihrerseits mit Extrazellulärmedium gefüllt war. Die

Referenzelektrode wurde während der Messungen in das auf den Zellen befindliche Extrazellulärmedium am Rand der Halterung gelegt. Die Stimulationselektrode wurde mithilfe eines Mikromanipulators in unmittelbare Nähe der zu stimulierenden Zelle gebracht. Beide Elektroden waren mit einem Stimulationsgeber, der einen Puls von 100  $\mu$ A Stärke gab, verbunden. Um herauszufinden, unter welchen Stimulationsbedingungen DRG-Neurone am effektivsten LDCVs am Soma sezernieren, wurden zunächst verschiedene Einstellungen der Feldelektrode getestet. Diese unterschieden sich in ihrer Pulslänge und der Frequenz. Folgende Konditionen wurden getestet: 3 ms bei 50 Hz, 5 ms bei 50 Hz, 9 ms bei 50 Hz, 2 ms bei 100 Hz, 3 ms bei 100 Hz und 4 ms bei 100 Hz. Zur Analyse der LDCV-Sekretion wurden 3-minütige TIRFM-Filme von DRG-Neuronen aufgenommen, wobei jeweils 20, 80 und 120 s nach Beginn der TIRFM-Aufnahme für je 30 s mit der Feldelektrode stimuliert wurde (Abbildung 5 A). Des Weiteren wurde auch die Exozytose von LDCVs bei Langzeitstimulation gemessen. Hierfür wurden 3-minütige TIRFM-Aufnahmen gemacht, wobei nach einer Minute die Stimulation mit 3 ms Pulslänge bei 100 Hz Frequenz begonnen wurde und bis zum Ende der Aufnahme anhielt (Abbildung 5 B). Die letzte Bedingung, die zur Induktion der Exozytose von LDCVs getestet wurde, war ebenfalls eine Langzeitstimulation. Allerdings wurden in diesem Fall die Zellen, zunächst ohne gleichzeitige TIRFM-Aufnahme, 3 min mit einem Puls von 3 ms Länge bei 5 Hz stimuliert. Dann wurde eine 4-minütige TIRFM-Aufnahme gestartet, wobei in der ersten Minute der Aufnahme der gerade beschriebene niederfrequente Stimulus appliziert wurde. Nach dieser Minute wurde die Frequenz des Stimulus auf 100 Hz erhöht. Dieser Stimulus wurde wiederum bis zum Ende der TIRFM-Aufnahme appliziert (Abbildung 5 C). Alle getesteten Stimulationsprotokolle sind in Abbildung 5 noch einmal schematisch dargestellt.



**Abbildung 5 : Schematische Darstellung der Stimulationsprotokolle für alle getesteten Feldelektrodenstimulationen.** A) Repetitive Stimulation mit einem Puls von 100  $\mu$ A Amplitude, verschiedenen Pulslängen und Frequenzen. B) Langzeitstimulation mit einem Feldelektrodenpuls der Stärke 100  $\mu$ A, einer Länge von 3 ms und einer Frequenz von 100 Hz mit Beginn 1 Minute nach Start der TIRFM-Aufnahme. C) Langzeitstimulation mittels Feldelektrode mit einer Pulsstärke von 100  $\mu$ A. Vor Beginn der TIRFM-Aufnahme wurde ein Puls appliziert mit einer Länge von 3 ms bei 5 Hz. 1 Minute nach Beginn der Aufnahme wurde die Frequenz des Pulses auf 100 Hz erhöht, wobei die anderen Parameter der Stimulation gleich blieben.

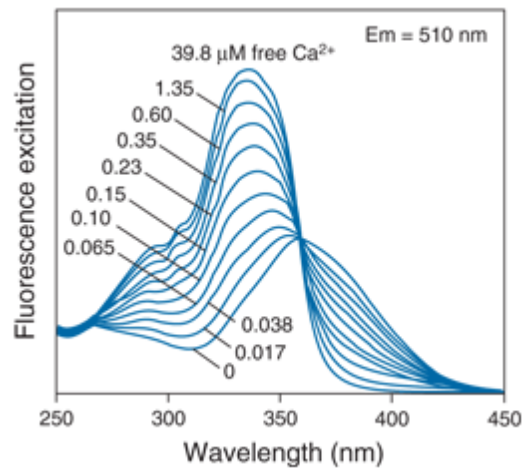
Die generierten TIRFM-Aufnahmen wurden zur Analyse mit dem Programm Image J geöffnet und die Sekretion der LDCVs visuell analysiert. Die Zeitpunkte der Sekretion wurden notiert und die Sekretion wurde für alle getesteten Stimulationskonditionen in Excel in gemittelten, kumulativen Graphen dargestellt. Da sich bei der Analyse der Sekretionsereignisse zeigte, dass es scheinbar verschiedene Modi der Sekretion von LDCVs in DRG-Neuronen gibt, wurde jedes einzelne Ereignis noch einmal genauer analysiert. Hierzu wurden in den TIRFM-Aufnahmen mit Image J für jedes Sekretionsereignis zwei kreisförmige Regionen generiert. Eine umfasste ausschließlich das Fluoreszenzsignal des Vesikels, die zweite Region schloss das Vesikel und einen kleinen Teil der es umgebenden Region ein. Für jede Region wurde der mittlere Grauwert jeden Bildes 2 s vor und 2 s nach Sekretion ermittelt. Für die weiterführende Analyse wurden die Werte des inneren Ringes von dem des äußeren Ringes subtrahiert. Diese Werte wurden als Fluoreszenzintensität über die Zeit in einem Graphen in Excel dargestellt. Um die Art der Vesikelfusion zu ermitteln, wurden die Grauwerte der Vesikel aus Excel in das Programm Igor übertragen. Für diese Software wurde von Dr. Detlef Hof ein spezielles Makro geschrieben, das automatisch und nach bestimmten, selbst gesetzten Kriterien die Fluoreszenzverläufe einzelner Vesikel bestimmten Fusionstypen zuordnen konnte. Die Kriterien, die das Makro berücksichtigte, waren die Dauer des

Anstieges der Fluoreszenz und der Level der Fluoreszenz vor und nach Fusion. So konnten die Vesikel in drei Haupt-Fusionsarten unterteilt werden. Die Definition der Parameter zur Unterteilung in verschiedene Fusionstypen ist in Teil 3.2. dieser Arbeit beschrieben. Mithilfe des Programms Igor Pro wurden anschließend die Parameter Anstiegszeit der Fluoreszenz, Breite der Spitzenamplitude, Abfallszeit der Fluoreszenz und Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Fusionstypen analysiert.

#### **2.2.6.2. Calcium-Imaging**

Calcium ist ein wichtiger Mediator der Sekretion von SVs, aber auch von LDCVs. Deshalb kann man mithilfe von Calciumindikatoren die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration in Ruhe oder nach Stimulation quantifizieren. Diese Indikatoren können über verschiedene Wege in die Zelle eingebracht werden. Zum einen ist es möglich, sie über eine Patch-Pipette bei gleichzeitigen elektrophysiologischen Messungen in das Lumen der Zelle diffundieren zu lassen. Zum anderen wurden veresterte Indikatoren entwickelt, die passiv über die Zellmembran diffundieren können, sogenannte Acetoxymethylester-Indikatoren. Die Acetoxymethylester der Farbstoffe werden im Zellinneren durch Esterasen entfernt, wodurch der Indikator nun frei im Lumen der Zelle vorliegt und dort gehalten wird. In dieser Arbeit wurde der Calciumindikator Fura-2 AM benutzt. Um DRG-Neurone mit dem Indikator zu laden, wurden die im Abschnitt 2.2.2. erwähnten Deckgläser, auf denen die DRG-Neurone kultiviert wurden, in eine Petrischale gelegt, in der Fura-2 AM in 2 ml Optimem in einer Konzentration von 2  $\mu$ M vorlag. Die Zellen wurden in dieser Lösung für 15 min bei 37 °C inkubiert.

Bei Fura-2 handelt es sich um einen ratiometrischen Calciumindikator, was bedeutet, dass man die intrazelluläre Calciumkonzentration durch die Messung der Fluoreszenzintensität bei Anregung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen (350 nm und 380 nm) und einer vorherigen Eichung des Setups mit Lösungen definierter Calciumkonzentration genau bestimmen kann.



**Abbildung 6 : Calciumabhängiges Emissionsspektrum des Calciumindikators Fura-2.** (Bildquelle: <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/indicators-for-ca2-mg2-zn2-and-other-metal-ions/fluorescent-ca2-indicators-excited-with-uv-light.html#head1>)

Abbildung 6 zeigt die Änderung der Absorption von Fura-2 bei der Anregung mit verschiedenen Wellenlängen in Abhängigkeit der Calciumkonzentration. Bei hohen Calciumkonzentrationen wird Fura-2 stärker bei 350 nm angeregt, bei niedrigen Calciumkonzentrationen hingegen liegt das Absorptionsmaximum bei 380 nm. Bildet man nun den Quotienten (350 nm/380 nm), nivellieren sich Artefakte heraus und man kann an einem auf Fura-2 geeichten Mikroskop die genaue Calciumkonzentration in einer Zelle bestimmen. Der  $K_d$ , also der Wert, bei dem die Hälfte aller Calciumbindestellen des Indikators besetzt sind, von Fura-2 liegt mit 135 nM (bzw. 224 nM in Anwesenheit von 1 mM  $Mg^{2+}$ ) etwa bei der Calciumkonzentration, die Säugetierzellen im Ruhezustand besitzen (100 nM).

Zur Messung an mit Fura-2 geladenen DRG-Neuronen wurden die Deckgläser mit den Zellen in die bereits erwähnte Messkammer eingespannt und in ein Mikroskop über einem 40x-Ölimmersionsobjektiv eingelegt. Zellen wurden mit verschiedenen Methoden (siehe 2.2.6.1) stimuliert, um die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration zu beobachten. Die Belichtung der Zellen fand abwechselnd mit Licht der Wellenlängen 350 nm und 380 nm statt, welches über einen Monochromator generiert wurde. Die Belichtungszeit betrug jeweils 100 ms, die Aufnahmefrequenz der Filme 10 Hz. Zur Analyse wurden die in Metamorph aufgenommenen TIRFM-Filme zunächst mit der Freeware Image J geöffnet. Dort wurden aus einer TIRFM-Aufnahme zwei, nach Wellenlänge der Beleuchtung getrennte Filme generiert. Dann wurde eine kleine Region außerhalb der Zellen als Hintergrundwert

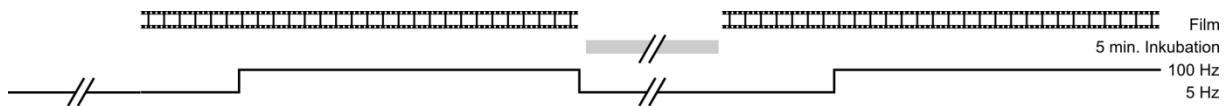
festgelegt und dieser von allen Bildern der Filme abgezogen. Anschließend wurden in beiden Filmen, an den jeweils gleichen Stellen, Regionen über die Zellkörper der Neurone gelegt und deren mittlerer Grauwert für jedes Bild der Aufnahme bestimmt. Diese Werte wurden in Excel übertragen, wo zunächst der Quotient der Werte bei 350 nm und 380 nm gebildet wurde. Die so generierten Werte konnten grafisch als Verlauf der Fluoreszenzintensität über die Zeit dargestellt werden. Da das verwendete Setup nicht kalibriert war, konnten nur Fluoreszenzintensitäten, nicht aber genaue Calciumkonzentrationen dargestellt werden.

### **2.2.7. Modulation der LDCV-Sekretion durch NPY-Applikation**

Da DRG-Neurone verschiedenste Arten von Neuromodulatoren in ihren LDCVs tragen, mit denen sie autokrin, aber auch parakrin wirken können, wurde für die Untersuchung zur Modulation der LDCV-Sekretion ein Neuromodulator gewählt, der in der Schmerzwahrnehmung eine Rolle spielt und endogen in einigen DRG-Neuronen vorkommt. Die Wahl fiel auf NPY, da es das am häufigsten vorkommende Neuropeptid ist. Zur Beobachtung einer möglichen Modulation der Sekretion wurden erneut Experimente mit TIRFM durchgeführt und die Sekretion, wie bereits im Abschnitt 2.2.6.1. beschrieben, mit einer Feldelektrode induziert. Der gewählte Stimulus war der bereits beschriebene Langzeitstimulus für 3 min bei einer Pulsamplitude von 100  $\mu$ A und einer Länge von 3 ms bei einer Frequenz von 100 Hz mit einer vorhergehenden, niederfrequenten Prä-Stimulation bei 5 Hz für 4 min. Die mit dem Lenti-Virus (NPY-Venus) transduzierten Neurone wurden an dem bereits beschriebenen TIRFM-Setup mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv beobachtet. Zunächst wurden 4-minütige TIRFM-Aufnahmen einer Zelle, mit gleichzeitiger Stimulation durch die gerade beschriebene Feldelektrodenstimulation, gemacht. Anschließend wurde die auf 32 °C erwärmte Badperfusion abgeschaltet und 100  $\mu$ l einer 1  $\mu$ M NPY-Lösung mittels einer Präzisionsperfusion direkt auf die zu untersuchende Zelle appliziert. Durch die auf den Zellen verbliebene restliche Extrazellulärlösung (~2 ml) ergab sich eine 0,05  $\mu$ M NPY-Lösung, in der die Zellen für 5 Minuten ohne TIRFM-Aufnahme inkubiert wurden. Kurz vor Ablauf der 5-minütigen Inkubation wurde das NPY durch Anschalten der Badperfusion wieder ausgewaschen. Es folgte eine weitere TIRFM-Aufnahme derselben Zelle für 4 Minuten mit dem gleichen Stimulationsprotokoll, wie bereits beschrieben. Während der Inkubation wurde der Stimulus der Feldelektrode auf den niederfrequenten Stimulus umgestellt und



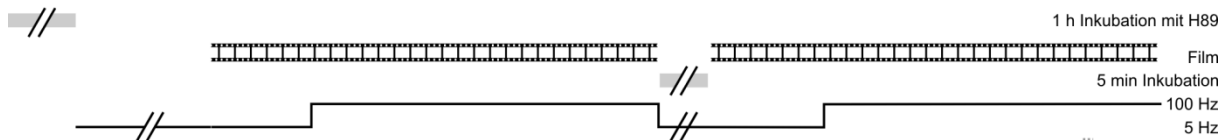
konstant appliziert, bis die Frequenz 1 Minute nach Beginn der zweiten TIRFM-Aufnahme wieder auf 100 Hz erhöht wurde. Als Kontrolle wurden Zellen aufgenommen, die statt der 5-minütigen Inkubation mit NPY 5 Minuten in Extrazellulärlösung inkubiert wurden. Abbildung 7 zeigt schematisch die Messbedingungen.



**Abbildung 7 : Schematische Darstellung des Stimulationsprotokolls zur Untersuchung der Modulation der LDCV-Sekretion durch NPY.** Bei der Stimulation handelte es sich um eine Langzeitstimulation mittels Feldelektrode mit einer Pulsstärke von 100  $\mu$ A. Vor Beginn der TIRFM-Aufnahme wurde für 3 min ein Puls appliziert mit einer Länge von 3 ms bei 5 Hz. 1 Minute nach Beginn der Aufnahme wurde die Frequenz des Pulses auf 100 Hz erhöht, wobei die anderen Parameter der Stimulation gleich blieben. Die hochfrequente Stimulation dauerte 3 min bis zum Ende der ersten TIRFM-Aufnahme. Darauf folgte eine 5-minütige Inkubation der Zellen mit 0,05  $\mu$ M NPY, bzw. Extrazellulärmedium bei gleichzeitiger 5 Hz Stimulation. Dieser schloss sich eine zweite TIRFM-Aufnahme an, in der erneut 1 Minute nach Beginn die Frequenz des Stimulus auf 100 Hz erhöht wurde.

Ansonsten wurden die Zellen in beiden Messungen gleichbehandelt. Die Analyse der Sekretion erfolgte wie im Abschnitt 2.2.6.1. beschrieben.

In einer weiteren Messreihe wurde überprüft, ob der NPY-induzierte Effekt auf die Sekretion von LDCVs in DRG-Neuronen reversibel ist und ob der Proteinkinase A (PKA)-Signalweg durch NPY aktiviert wird. Wird dieser Signalweg durch die Bindung eines Stoffes an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor aktiviert, wird zunächst Adenylatcyclase (AC) aktiviert. Diese bewirkt die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). cAMP seinerseits aktiviert PKA, welches schließlich verschiedenste Zielproteine in der Zelle phosphorylieren kann und somit deren Aktivität verstärkt (bspw. Calciumkanäle, CREB, etc.). Zur Überprüfung der Hypothese wurden erneut Experimente mit TIRFM durchgeführt, die im Ablauf ähnlich den gerade beschriebenen Messungen mit NPY-Inkubation waren. Einziger Unterschied war eine 1-stündige Präinkubation der Zellen mit 30  $\mu$ M des PKA Inhibitors H-89. Das Messprotokoll ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.



**Abbildung 8 : Schematische Darstellung des Stimulationsprotokolls zur Untersuchung des durch NPY aktivierten Signalweges.** Zunächst wurden DRG-Neurone 1 h bei 37 °C in DRG-Zellkultur-Medium mit 30  $\mu$ M H-89 inkubiert. Bei der anschließenden Stimulation handelte es sich um eine Langzeitstimulation mittels Feldelektrode mit einer Pulsstärke von 100  $\mu$ A. Vor Beginn der TIRFM-Aufnahme wurde für 3 min ein Puls mit einer Pulslänge von 3 ms bei 5 Hz appliziert. 1 Minute nach Beginn der Aufnahme wurde die Frequenz des Pulses auf 100 Hz erhöht, wobei die anderen Parameter der Stimulation gleich blieben. Die hochfrequente Stimulation dauerte 3 min bis zum Ende der ersten TIRFM-Aufnahme. Darauf folgte eine 5-minütige Inkubation der Zellen mit 0,05  $\mu$ M NPY bzw. Extrazellulärmedium bei gleichzeitiger 5 Hz Stimulation. Dieser schloss sich eine zweite TIRFM-Aufnahme an, bei der erneut 1 Minute nach Beginn die Frequenz des Stimulus auf 100 Hz erhöht wurde.

### 2.2.8. Patch-Clamp-Technik

Zur Untersuchung von Ionenströmen über die Membran von Zellen eignet sich besonders die elektrophysiologische Patch-Clamp-Technik, die in den 1970er Jahren von dem deutschen Biophysiker Erwin Neher und dem Mediziner Bert Sakmann entwickelt wurde (Neher und Sakmann, 1976). Es gibt, je nach Fragestellung, zwei Möglichkeiten, wie Zellen mit dieser Methode gemessen werden können. Zum einen misst man Ionenströme, indem man verschiedene Spannungen an eine Zelle anlegt (Voltage-Clamp). Zum anderen lässt sich die Änderung des Membranpotentials durch Vorgabe eines bestimmten Stroms messen (Current-Clamp). In dieser Arbeit wurden Zellen ausschließlich im Voltage-Clamp-Modus gemessen, da untersucht werden sollte, ob NPY die Ströme bestimmter Ionen beeinflusst. Für diese Art von Messung sind elektrisch erregbare Zellen wie beispielsweise Neurone besonders gut geeignet. Denn wird deren Ruhemembranpotential, das auf der Ungleichverteilung von Ionen zwischen Zellinnerem und -äußeren beruht, durch Stimulation verändert, müssen sie dieses schnellstmöglich wiederherstellen, um auf eine erneute Stimulation reagieren zu können. Die Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials erfolgt durch den Ein- bzw. Ausstrom verschiedener Ionen wie Natrium, Kalium oder Calcium durch entsprechende Ionenkanäle. Diese Eigenschaft macht man sich mit der Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus zunutze. Hierbei werden Zellen zunächst auf ein bestimmtes Potential, ihr Ruhemembranpotential, geklemmt, wobei zunächst kein Strom fließt. Verändert man das angelegte Potential, misst man den Ausgleichsstrom, der über die Zellmembran fließt, um das Ruhemembranpotential wiederherzustellen.

Um DRG-Neurone mit dieser Methode messen zu können, benötigte man zunächst dünne Glaskapillaren mit einem Widerstand von ca. 1-3 M $\Omega$ . Diese wurden mithilfe eines sogenannten Pullers (P-97, Sutter Instruments) auf die gewünschte Größe gezogen. In diese Kapillare wurde eine Lösung (Intrazellulärlösung, siehe 2.1.3 Lösungen) eingefüllt und anschließend eine Elektrode, die aus einem chlorierten Silberdraht bestand, eingeführt. Diese Messelektrode (Pipette) war mit einer Referenzelektrode verbunden, die während der Messungen in die auf den Zellen befindliche Extrazellulärlösung getaucht wurde. Beide Elektroden waren mit einem Vorverstärker und einem Verstärker (EPC10, HEKA) verbunden. Gesteuert wurden die Messungen über die Software Pulse. An die Messelektrode wurde zunächst ein Unterdruck angelegt und diese mithilfe eines Mikromanipulators an die Zelle gebracht. Die Zellen befanden sich, wie bereits beschrieben, auf Deckgläsern, die in eine dichte Messkammer eingespannt wurden. Sobald die Spitze der Pipette die Zellmembran berührte, wurde der Unterdruck ausgeglichen, wodurch das unter der Pipette befindliche Membranstück, der Patch, an die Pipette gesaugt wurde. So wurde zunächst die sog. On-Cell-Konfiguration hergestellt. Um die Ströme der gesamten Zelle messen zu können, musste im nächsten Schritt der Patch durch erneutes Anlegen von Unterdruck vorsichtig aufgerissen werden, sodass sich die Intrazellulärlösung mit dem Cytosol der Zelle vermischen konnte (Whole-Cell-Konfiguration). Vor dem Aufreißen des Patches musste darauf geachtet werden, dass zwischen Pipette und Zellmembran ein hoher Abdichtungswiderstand im Giga- $\Omega$  Bereich, der sog. Giga-Seal, erreicht wurde. Dieser ist zwingend notwendig, um die Messung von Leckströmen, die zwischen Pipette und Membran fließen können, wenn der Abdichtungswiderstand nicht groß genug ist, zu vermeiden. Zum Messen der Ströme wurden die Neurone zunächst auf ein Haltepotential von -70 mV geklemmt und anschließend in 10 mV Schritten aufsteigend bis zu einer Spannung von +20 mV depolarisiert. Der Serienwiderstand wurde automatisch im Programm Pulse kompensiert. Die Depolarisationsreihen wurden mehrere Male hintereinander durchgeführt. Ausgewertet wurden letztendlich die Ströme vor Inkubation bzw. unmittelbar nach Inkubation mit 0,05  $\mu$ M NPY bzw. Kontrolllösung. Die Inkubationen dauerten, wie in den bereits beschriebenen Experimenten mit TIRFM, 5 Minuten. Während der Messungen wurden die Zellen ständig mit frischem Extrazellulärmedium, welches auf ca. 32 °C erwärmt wurde, umspült. Die Auswertung der Ströme wurde zunächst in Pulse direkt vorgenommen. Dort wurden Abschnitte der Stromkurven, die bestimmten Ionenströmen zugeordnet werden

können, definiert und ihre Maximalwerte bei den verschiedenen Spannungen notiert. So konnten die Werte des Natriumstroms, des Calciumstroms und des Tail-Currents aus den Kurven isoliert werden. Um die Stromdichte der einzelnen Ströme zu erhalten, wurden die Mittelwerte der Ströme durch die mittlere Zellgröße dividiert. So konnten in Excel entsprechende Strom-Spannungsdichtekurven der verschiedenen Ströme erstellt und verglichen werden.

### **2.2.9. Immuncytochemie und Laser Scan Mikroskopie (LSM)**

Zur Beobachtung der Lokalisation von Proteinen in Zellen bzw. zum Nachweis, ob ein bestimmtes Protein in einer Zellart exprimiert ist, eignet sich die Immuncytochemie besonders gut. Hier kann mithilfe von spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen der Ort eines Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle sichtbar gemacht werden. Zur Gewinnung von Antikörpern können das zu untersuchende Protein oder Fragmente des Proteins in ein Tier, beispielsweise ein Kaninchen, injiziert werden. In dem Tier wird durch die Injektion eines Fremdproteins eine Immunreaktion hervorgerufen, bei der Antikörper gegen das Protein gebildet werden. Diese können schließlich aus dem Plasma des Tieres aufgereinigt werden. Gibt man diese Antikörper nun auf eine Probe, können sie dort bei Vorhandensein des Proteins an bestimmten Stellen, den Epitopen, binden. Sollen Antikörper nur gegen ein bestimmtes Epitop eines Proteins gerichtet sein (monoklonale Antikörper), was deren Spezifität erhöht, so werden diese mit der sog. Hybridom-Technik gewonnen. Um nun das Protein mikroskopisch sichtbar zu machen, kann ein Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden (direkte Immunmarkierung). Alternativ inkubiert man die Probe zunächst mit einem nicht gekoppelten Primärantikörper, der gegen ein bestimmtes Protein gerichtet ist, und detektiert diesen dann seinerseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper (indirekte Immunmarkierung). Diese Sekundärantikörper erkennen bestimmte Regionen auf dem Primärantikörper, die durch die Spezies, in der ein Primärantikörper generiert wurde, festgelegt sind. Die indirekte Immunmarkierung hat gegenüber der direkten den Vorteil einer Signalverstärkung. Kann bei der direkten Markierung pro vorhandenem Epitop nur ein Antikörper mit einem Fluorophor binden, so können bei der indirekten Markierung mehrere fluoreszenzgekoppelte sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden. Im Gegensatz zu den meist monoklonalen

Primärantikörpern, die nur ein Epitop eines Proteins erkennen, sind sekundäre Antikörper in der Regel polyklonal und erkennen verschiedene Epitope. So können selbst nur in geringen Mengen exprimierte Proteine mit indirekter Immunmarkierung sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde in DRG-Neuronen mittels indirekter Immunocytochemie auf das Vorhandensein des „cAMP response element-binding proteins“ (CREB) beziehungsweise dessen phosphorylierter Form (Phospho-CREB) getestet. Mit dieser Methode sollte überprüft werden, ob NPY nach Bindung an einen extrazellulären Rezeptor den Signalweg der Proteinkinase A (PKA) aktiviert, bei der die Phosphorylierung von CREB im Zellkern einen der Endpunkte der Signalkaskade darstellt. Phosphoryliertes CREB vollzieht eine Konformationsänderung, was zur Bildung von Homodimeren führt, die an bestimmte Sequenzen (cAMP response element) von Promotoren einiger Gene binden und so die Transkription dieser Gene verstärken können.

Zur Überprüfung, ob NPY über die Bindung an ein G-Protein gekoppelten Rezeptor die intrazelluläre Signalkaskade über AC und PKA auslöst, wie in Endoh et al. (2012) in einem anderen Zelltyp beschrieben, wurden DRG-Neurone auf Deckgläsern zunächst mit 1  $\mu$ M NPY in 1 ml DMEM für 25 min bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle für die Aktivierung des PKA-Signalweges diente eine Inkubation in 50  $\mu$ M Forskolin (5 mM Stock in DMSO, verdünnt in DMEM), einem Aktivator der AC, ebenfalls für 25 min bei 37 °C. Als Negativkontrolle diente eine Präinkubation der Neurone mit 30  $\mu$ M H-89, einem Blocker der PKA, in Tris-NaCl für 1 h bei 37 °C.

Nach diesen Inkubationen wurden die Deckgläschen zweimal mit je 1 ml Tris-NaCl gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) pro Deckglas für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. PFA dient dazu, die Zellen in einem bestimmten Zustand zu konservieren. Die Zellstruktur wird aufrechterhalten und ein Auswaschen von Proteinen aus der Zelle in späteren Schritten des Protokolls wird vermieden. Auf diesen Fixierschritt folgten drei 3-minütige Waschschrte mit je 1 ml Tris-NaCl. Zur Abmilderung von Autofluoreszenz wurden die Zellen in einem nächsten Schritt mit einer Quenching-Lösung mit 50 mM Glycin für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten erneut 3 Waschschrte für je 3 min mit Tris-NaCl. Als Nächstes wurden die Zellen in einer Lösung mit dem Detergens Triton X-100 30 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Dieser Schritt ist nötig, da das zu untersuchende Protein CREB intrazellulär vorliegt und durch das Detergens den Antikörpern der Zugang zum Zellinneren ermöglicht

wird. Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen des Antikörpers wurden die Zellen anschließend dreimal 3 Minuten bei Raumtemperatur mit einer NGS (engl.: normal goat serum; normales Ziegen Serum)-haltigen Blockierlösung (siehe 2.1.3 Lösungen) gewaschen. Da Antikörper unterschiedliche Spezifitäten haben, muss darauf geachtet werden, dass zunächst getestet wird, in welcher Konzentration diese das beste Signal-Rausch-Verhältnis zeigen. Für den CREB-Antikörper zeigten sich die besten Resultate bei einer 1:400 Verdünnung, während der Phospho-CREB Antikörper bei einer 1:500 Verdünnung in Blockierlösung die besten Resultate zeigte. Zur Inkubation der Neurone mit den primären Antikörpern wurde eine Ø 92 mm Petrischale auf dem Boden mit Parafilm ausgelegt. Zur Herstellung einer „feuchten Kammer“, die ein Austrocknen der Proben und ein Verdunsten der Antikörperlösung verhindern soll, wurden entlang des Randes der Schale in Wasser getränkte Tücher platziert. Auf den Parafilm wurden pro Deckglas 100 µl Antikörperlösung getropft. Die Deckgläser wurden dann mit der Zellseite auf die Tropfen gelegt und 1 h bei Raumtemperatur in der „feuchten Kammer“ inkubiert. Um den primären Antikörper abzuspielen, wurden die Deckgläser anschließend dreimal 3 Minuten mit je 1 ml Blockierlösung gewaschen. Auch hier sollte der Zusatz NGS unspezifische Bindungen des nun folgenden Sekundärantikörpers reduzieren. Als Sekundärantikörper wurden Alexa Fluor 568 goat anti mouse (gerichtet gegen den in Mäusen generierten CREB Antikörper) und Alexa Fluor 647 goat anti rabbit (gerichtet gegen den in Kaninchen hergestellten Phospho-CREB Antikörper) Antikörper, jeweils in einer Verdünnung von 1:2000, eingesetzt. Nachdem die Tropfen des Primärantikörpers vom Parafilm abgenommen wurden und dieser mit etwas Blockierlösung gewaschen wurde, wurden 100 µl große Tropfen der in Blockierlösung gelösten Sekundärantikörper auf den Parafilm gegeben. Die Deckgläser wurden erneut mit der Zellseite auf die Tropfen gelegt und 45 min in der „feuchten Kammer“ bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal 3 min mit Blockierlösung und dreimal 3 Minuten mit Tris-NaCl gewaschen, um die letzten Reste der Antikörper vollständig zu entfernen und die Hintergrundfärbung zu verringern. Pro Deckglas wurde je ein Objektträger vorbereitet, auf den ein 20 µl großer Tropfen Mounting Medium (siehe 2.1.3 Lösungen) vorgelegt wurde. Die Deckgläser wurden mit der Zellseite auf das Mounting Medium gelegt. Dieses Medium dient der Konservierung der Zellen. Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur oder mindestens 1 h bei 37 °C gelagert, sodass das Mounting Medium trocknen und aushärten konnte. Um ein komplettes

Austrocknen der Proben zu verhindern, wurde der Rand der Deckgläser nach der Trocknung mit etwas Nagellack versiegelt und die Proben bis zur Untersuchung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Proben wurden mittels konfokaler Laser Scan-Mikroskopie untersucht. Bei dieser Art der Mikroskopie handelt es sich um eine Mikroskopie-Technik, die Bilder mit einem sehr hohen Signal-Rausch-Verhältnis generiert. Die sehr gute Auflösung kommt dadurch zustande, dass eine Probe nur in kleinen Abschnitten beleuchtet und nach und nach abgerastert wird. Weiterhin sorgt eine Lochblende (engl.: Pinhole) im Strahlengang des emittierten Lichts dafür, dass nur emittiertes Licht des aktuell fokussierten Punktes in den Detektor gelangen kann. Durch die Einstellung der Größe dieser Lochblende ist es möglich, sehr kleine Segmente eines Präparates mit einer sehr hohen Auflösung abzubilden, da kaum Streulicht aus unfokussierten Bereichen existiert. Schließlich können die Fluoreszenzsignale eines bestimmten Zeitabschnitts einem Bildpunkt zugeordnet und mit entsprechender Software digital zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden.

An einem LSM 780 Mikroskop (Zeiss) mit einem 40x Ölimmersionsobjektiv wurden Z-Stack Aufnahmen von definierten Regionen der Proben gemacht. Die Anzahl und Dicke der Bildebenen wurde für jede Aufnahme einzeln angepasst. Der Aufnahmemodus wurde auf „höchster“ gestellt, als Scan-Modus wurde „Linie“ gewählt und um die Qualität der Aufnahmen zu verbessern, wurden 2 Aufnahmen der gleichen Region gemittelt. Die Bit-Tiefe betrug 16 Bit und die Pixelgröße wurde auf 0,11 µm festgelegt. Weiterhin wurde der Mastergain auf 550 und das Pinhole auf 2,2 µm sections eingestellt. Die Laserstärke zur Anregung des Alexa Fluor 568 Antikörpers, dem Sekundärantikörper gegen den CREB Antikörper, wurde auf 5 % gestellt, zur Anregung des Alexa Fluor 647 Antikörpers wurde eine Laserintensität von 6 % gewählt. Da im Folgenden Fluoreszenzintensitäten verglichen werden sollten, wurden diese Laserintensitäten für alle Aufnahmen beibehalten. Zur Analyse der Färbungen wurden die Aufnahmen im Programm Image J geöffnet. Zunächst wurde eine kleine Region im Soma einer Zelle als Hintergrund festgelegt und dieser von allen Bildern einer Aufnahme subtrahiert. Anschließend wurden Regionen um den Nukleus jeder Zelle definiert, da dort die Lokalisation von CREB bzw. Phospho-CREB zu erwarten war. Die mittleren Grauwerte einzelner Nuklei wurden für beide Färbungen in Excel übertragen. Dort

wurde der Quotient aus den Grauwerten für Phospho-CREB und CREB gebildet und die verschieden behandelten Gruppen miteinander verglichen.

### 2.2.10. Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm Sigma Plot durchgeführt. Für alle Daten aus Experimenten mit TIRFM wurden ANOVA-Tests durchgeführt. Bei einer Normalverteilung der Daten wurde ein ANOVA- mit anschließendem Student-Newman-Keuls Post-hoc-Test durchgeführt. Waren die Daten nicht normal verteilt, wurden sie mit einem ANOVA on Ranks und einem anschließenden Dunn's-Test auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft. Fehlerbalken in Graphen zeigen immer den SEM (engl.: standard error of the mean; Standardfehler). Signifikanzen wurden in 3 Gruppen unterteilt: \* entspricht  $P \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $P \leq 0,01$  und \*\*\* entspricht  $P \leq 0,001$ .

In Patch-Clamp-Experimenten wurden zur statistischen Analyse normalverteilter Daten ein t-Test und für nicht-normalverteilte Daten ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt.



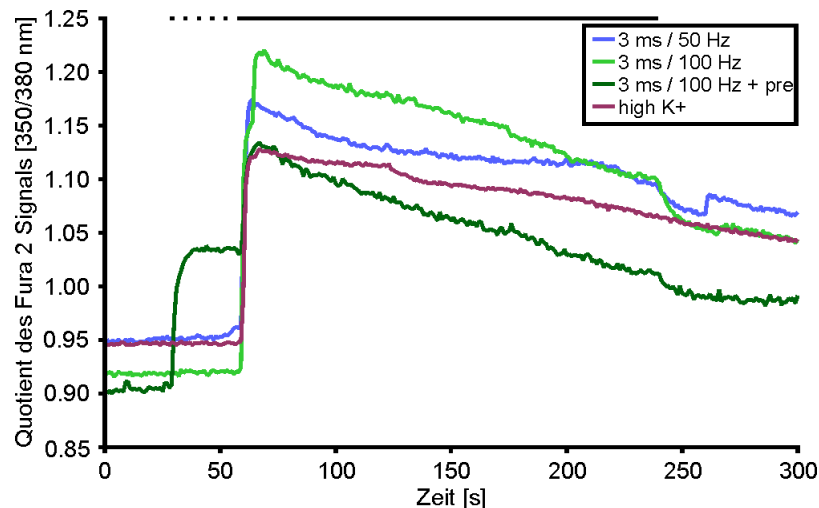
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Induktion von LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen

Peptiderge DRG-Neurone sind nicht nur in der Lage, Neurotransmitter aus SVs auf einen Stimulus hin zu sezernieren (Reizweiterleitung), sondern sie setzen ebenfalls neuromodulatorische Substanzen aus elektronendichten Granula (LDCVs) frei (Neuromodulation). Dies geschieht nicht, wie für SVs, an speziellen Stellen der Zelle wie aktiven Zonen in Synapsen, sondern LDCVs werden sowohl am Soma als auch in den Fortsätzen von DRG-Neuronen freigesetzt. Der Mechanismus der Exozytose von LDCVs in Neuronen ist bis heute kaum untersucht. Aus diesem Grund musste in dieser Arbeit zunächst geklärt werden, welche Art Stimulus benötigt wird, um LDCVs kontrolliert am Soma der Zellen freizusetzen. Diese Untersuchungen wurden mithilfe von Calcium- Imaging und TIRFM durchgeführt. Für Experimente mit TIRFM mussten die DRG-Neurone mit einem Lenti-Virus transduziert werden, dessen DNA für NPY-Venus codierte, welches spezifisch in LDCVs transportiert wird und diese so für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sichtbar machte.

Es wurden unterschiedliche Arten der Stimulationen zur Auslösung von LDCV-Sekretion getestet. Zum einen wurden Zellen mit einer 60 mM Kaliumlösung auf 0 mV depolarisiert. Zum anderen wurden verschiedene Einstellungen einer Feldelektrodenstimulation getestet, wobei Pulslänge und Pulsfrequenz variiert wurden, die Pulsamplitude wurde konstant auf 100  $\mu$ A gesetzt. Um zu erkennen, ob eine getestete Stimulation potenziell dazu geeignet ist, Sekretion von LDCVs in DRG-Neuronen zu induzieren, wurden für jeden getesteten Puls zunächst Calcium-Imaging-Experimente durchgeführt. Der Einsatz des Calciumindikators Fura-2 AM zeigte zweifelsfrei, ob der gewählte Stimulus eine für die Exozytose von LDCVs wichtige, robuste Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) bewirkte (Huang und Neher, 1996).

In Abbildung 9 sind die gemittelten Quotienten (350 nm/380 nm) der Fura-2-Calciumsignale von vier verschiedenen Stimuli dargestellt. Die dargestellten Stimuli bzw. die durch sie hervorgerufenen Calciumantworten sind nur exemplarisch. Mittels TIRFM wurden später noch weitere Feldelektrodenkonditionen getestet.

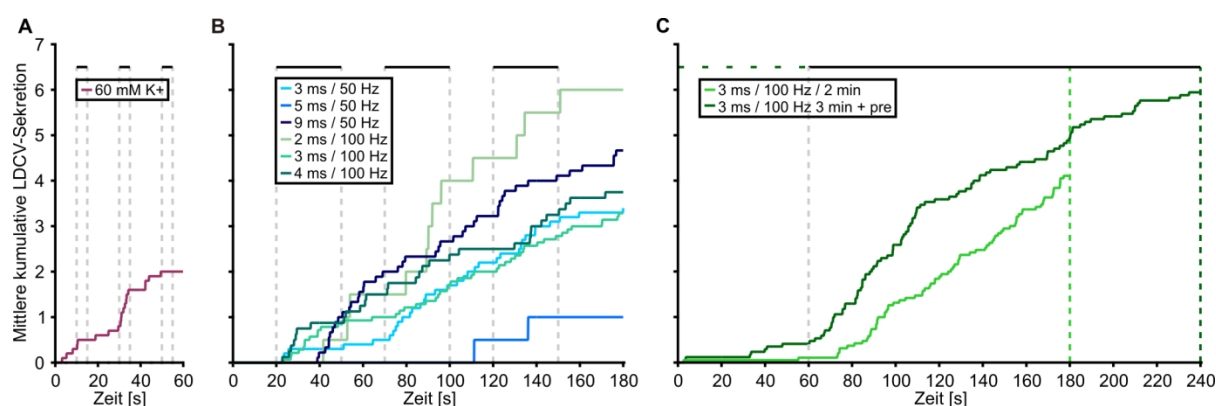


**Abbildung 9 : Feldelektrodenstimulation und Applikation einer 60 mM Kaliumlösung rufen ähnliche Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  in DRG-Neuronen hervor.** Nach dem Laden von DRG-Neuronen mit dem Calciumindikator Fura-2 AM wurden DRG-Neurone mit 60 mM Kalium (lila n=48) oder elektrisch per Feldelektrode stimuliert und für 5 min bei einer Aufnahmefrequenz von 10 Hz aufgenommen. Die Pulsamplitude betrug bei allen Feldelektrodenstimulationen 100  $\mu$ A, die Pulslänge 3 ms. Messungen in Blau wurden bei einer Pulsfrequenz von 50 Hz durchgeführt (n=44). Der Puls startete 60 s nach Beginn der Filmaufnahme und lag 3 min an. Bei den in Hellgrün dargestellten Messungen betrug die Stimulationsfrequenz 100 Hz 100 Hz (n=42). Die dunkelgrüne Kurve zeigt die Calciumantwort auf die gleiche Stimulation wie bei der hellgrünen Kurve, allerdings wurde zusätzlich 30 s nach Beginn der Aufnahme für 30 s ein niederfrequenter 5 Hz Prästimulus appliziert (n=59).

Abbildung 9 zeigt, dass alle getesteten Stimulationen, ob Feldelektrode oder 60 mM Kalium ( $high K^+$ ), eine für die Exozytose von LDCVs wichtige Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration unmittelbar nach Beginn der Stimulation bewirken. Des Weiteren weisen die Amplituden, also der Unterschied zwischen dem Calciumsignal vor Stimulation (Mittelwert der ersten 10 s der Messungen) und dem Maximalwert der Calciumantwort ( $\Delta$ ), aller Konditionen keine signifikanten Unterschiede auf:  $high K^+ \Delta = 0,19 \pm 0,02$ ; 3 ms / 50 Hz  $\Delta = 0,24 \pm 0,03$ ; 3 ms / 100 Hz  $\Delta = 0,31 \pm 0,04$ ; 3 ms / 100 Hz + pre  $\Delta = 0,24 \pm 0,03$ . Zusätzlich ist zu erkennen, dass bereits eine Stimulation bei niedriger Frequenz (5 Hz) einen Calciumeinstrom bewirkt und die Calciumkonzentration während des niederfrequenten Stimulus konstant bleibt. Die  $[Ca^{2+}]_i$  steigt jedoch bei niedriger Frequenz nicht maximal an, sondern lässt sich durch die Steigerung der Pulsfrequenz auf 100 Hz weiter erhöhen. Nach Ende der Stimulation ist bei allen getesteten Stimuli zu erkennen, dass sich die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder erniedrigt, was zeigt, dass die vorherige Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  auf die Stimulation zurückzuführen ist. Es wurden in der Abbildung keine absoluten Calciumkonzentrationen angegeben, obwohl deren Messung theoretisch mit dem ratiometrischen Calciumindikator Fura-2 AM möglich ist. Grund war zum einen die fehlende Eichung des Setups. Zum anderen

lag das Hauptaugenmerk der Messungen nicht darauf, exakte Calciumkonzentrationen zu bestimmen. Sie dienten lediglich als Schnelltest zur Erkennung, ob gewählte Stimuli generell zu einem Calciumeinstrom in DRG-Neurone führen und so theoretisch LDCV-Sekretion induziert werden kann.

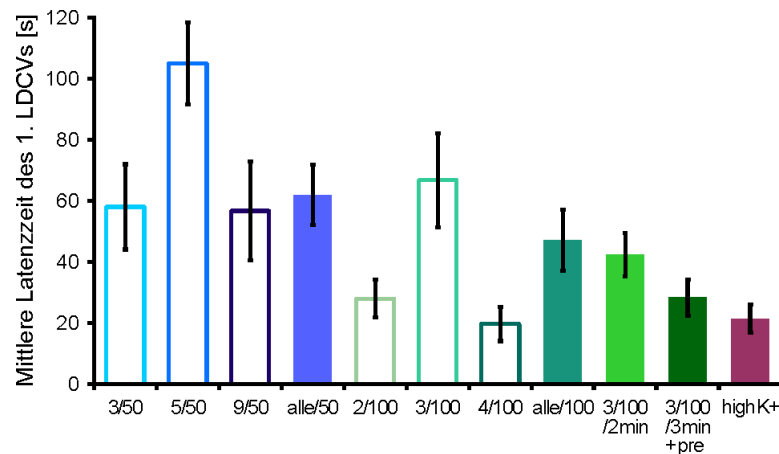
Es wurde bisher gezeigt, dass in DRG-Neuronen sowohl eine calciumabhängige als auch eine calciumunabhängige Exozytose von LDCVs existiert (Huang und Neher, 1996; Zhang und Zhou, 2002). Im nächsten Schritt dieser Arbeit galt es daher herauszufinden, ob die Stimuli, die in Calcium-Imaging-Experimenten zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  führten, auch in der Lage sind, die  $[Ca^{2+}]_i$  stark genug zu erhöhen, um calciumabhängige Exozytose von LDCVs einzuleiten. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit TIRFM an DRG-Neuronen durchgeführt, deren LDCVs durch die Überexpression von NPY-Venus fluoreszenzmarkiert waren. Es sollte getestet werden, bei welcher Art von Stimulation DRG-Neurone die größte Anzahl LDCVs sezernieren und wie akkurat die Sekretion zeitlich mit dem Stimulus gekoppelt ist (Messungen mit Applikation 60 mM Kaliumlösung siehe auch: Diplomarbeit Anneka Bost, Titel: „Untersuchung der Exozytose von Large Dense Core Vesikeln (LDCVs) und synaptischen Vesikeln (SVs) aus Neuronen der Spinalganglien“).



**Abbildung 10 : Sowohl 60 mM Kaliumlösung als auch Feldelektrodenstimulation induzieren LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen. Am effektivsten löst eine Langzeit-Feldelektrodenstimulation mit niederfrequentem Prästimulus LDCV-Exozytose aus.** Dargestellt ist jeweils die mittlere kumulative LDCV-Sekretion. A) Sekretion bei Applikation einer 60 mM K<sup>+</sup>-Lösung, 3-mal konsekutiv für je 5 Sekunden 10, 30 und 50 s nach Beginn der TIRFM-Aufnahme (n=10). B) Sekretion für verschiedene Konditionen einer Feldelektrodenstimulation. Getestet wurden verschiedene Pulslängen und Frequenzen (siehe Graphlegende). Die Amplitude aller Pulse betrug 100  $\mu$ A. Neurone wurden 3-mal konsekutiv für je 30 Sekunden 20, 70 und 120 s nach Beginn der TIRFM-Aufnahmen stimuliert ( $n_{3ms/50Hz}=10$ ;  $n_{5ms/50Hz}=2$ ;  $n_{9ms/50Hz}=9$ ;  $n_{2ms/100Hz}=2$ ;  $n_{3ms/100Hz}=14$ ;  $n_{4ms/100Hz}=8$ ). C) Sekretion für zwei verschiedene Langzeitstimulationen mittels Feldelektrode mit den Parametern 100  $\mu$ A Amplitude, 3 ms Pulslänge und einer Frequenz von 100 Hz. Eine Stimulation erfolgte für 2 min, mit Beginn 1 Minute nach Start der TIRFM-Aufnahme (hellgrün n=19). Die andere dargestellte Stimulation (dunkelgrün) erfolgte für 3 min, mit Beginn 1 Minute nach Start der TIRFM-Aufnahme. Diesem hochfrequenten Stimulus ging ein niederfrequenter Stimulus von 5 Hz für 4 min voraus (n=17).

Die beobachteten Exozytoseereignisse, die durch die Applikation verschiedener Stimuli ausgelöst wurden, sind als kumulative LDCV-Sekretion in Abbildung 10 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass mit allen getesteten Stimulationsarten LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen induziert werden kann, jedoch in sehr unterschiedlichen Raten. Eine Feldelektrodenstimulation mit einer Pulslänge von 3 ms bei einer Frequenz von 100 Hz erweist sich als am zuverlässigsten und zeitlich akkuratesten, um LDCVs aus den Somata von DRG-Neuronen freizusetzen. Die Stimulation mit 60 mM Kalium (Abbildung 10 A) wurde nicht weiter fortgeführt. Hier ist eine räumlich und zeitlich akkurate Stimulation durch die Art der Applikation der Stimulationslösung nicht gegeben. In Graph B sieht man, dass von den getesteten repetitiven Stimulationen mittels Feldelektrode, jener mit 2 ms Pulslänge bei 100 Hz, durchschnittlich die höchste LDCV-Sekretion hervorruft. Allerdings findet während der ersten und der dritten Stimulusapplikation kaum Sekretion statt. Mit dem Puls von 9 ms Länge bei 50 Hz ist die Anzahl der sezernierten Vesikel zwar ebenfalls hoch, allerdings ist die Sekretion zeitlich schlecht kontrollierbar mit der Stimulation, da ein großer Teil der Sekretion zwischen den Stimulationen beobachtet wurde. Da der Puls von 3 ms Länge bei 100 Hz eine robuste Sekretion auslöst, die größtenteils während der Stimulationsperioden stattfindet, wurde er für weiterführende Experimente gewählt. Es zeigte sich (Abbildung 10 C), dass bei einer Langzeitstimulation mit dem gerade beschriebenen Puls eine konstante LDCV-Sekretion über die gesamte Dauer der Stimulation induziert werden kann. Durch Hinzufügen eines niederfrequenten Prästimulus wird die Sekretionsrate noch weiter erhöht. Der Prästimulus selbst ruft allerdings kaum Sekretion hervor. Somit zeigt sich, dass für die Freisetzung von LDCVs aus dem Soma von DRG-Neuronen kurze Pulse bei einer sehr hohen Frequenz nötig sind.

Über die zeitliche Beziehung zwischen Stimulation und Sekretion von LDCVs in Neuronen ist bisher kaum etwas bekannt. In hippocampalen Neuronen und Interneuronen liegt diese im Sekundenbereich und ist damit, verglichen mit der Beziehung zwischen Stimulus und Sekretion von SVs (Millisekunden), eher schwach (Shinoda et al., 2011; Xia et al., 2009). Zur Aufklärung dieser Beziehung in DRG-Neuronen wurde daher in dieser Arbeit die Latenzzeit der Sekretion des ersten LDCVs nach Beginn der Stimulation für alle getesteten Stimulationen analysiert (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Die mittlere Latenzzeit des ersten sezernierten LDCVs nach Beginn der Stimulation unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Stimulationsarten.** Untersucht wurde die Latenzzeit des ersten Vesikels für alle bereits beschriebenen Stimulationsarten. Der Einfachheit und Vergleichbarkeit halber, wurden die Werte aller Stimulationen bei 50 Hz (alle/50 n=21) bzw. bei 100 Hz (alle/100 n=23) Pulsfrequenz zusammengefasst ( $n_{3/100/2min}=17$ ;  $n_{3/100/3min+pre}=17$ ;  $n_{highK^+}=10$ ). Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM.

Abbildung 11 zeigt, dass sich die Latenzzeiten des ersten sezernierten Vesikels zwischen den verschiedenen Stimuli nicht signifikant unterscheiden. Dennoch wird diese Zeitspanne tendenziell mit stärker werdendem Stimulus, sprich höherer Frequenz und länger anhaltender Stimulation, kürzer. So beträgt die gemittelte Latenzzeit bei den zusammengefassten 50 Hz Stimulationen  $61,8 \pm 9,8$  s (n=21). Bei Erhöhung der Pulsfrequenz auf 100 Hz verringert sich die Latenz auf  $46,9 \pm 10,0$  s (n=23). Eine Langzeitstimulation über 2 min verkürzt die Latenzzeit im Vergleich zu repetitiven Stimulationen kaum ( $42,2 \pm 7,1$  s) (n=17). Die Addition eines 5 Hz Prästimulus hingegen verringert sie auf  $28,3 \pm 5,9$  s (n=17). Die kürzeste Latenzzeit zeigt die Stimulation mit 60 mM  $K^+$ , sie beträgt  $21,3 \pm 4,7$  s (n=10). Trotz dieser nominell großen Unterschiede konnten mit einem One-Way ANOVA-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von LDCVs am Soma von DRG-Neuronen am effektivsten mit einer Langzeit-Feldelektrodenstimulation einer Amplitude von 100  $\mu$ A, einer Pulslänge von 3 ms, einer Frequenz von 100 Hz und einem vorausgehenden 5 Hz Prästimulus gleicher Pulsamplitude und -länge induziert werden kann. Auch andere getestete Stimulationen ermöglichten das Auslösen der Freisetzung der LDCVs, allerdings sprach für die Benutzung des gerade beschriebenen Stimulus in weiterführenden Experimenten, dass mit ihm eine große Anzahl an LDCVs freigesetzt werden konnte, die Sekretion stetig und robust über den gesamten Zeitraum der Stimulation stattfand und

somit die Stimulation zeitlich und räumlich (im Vergleich zur Applikation einer Stimulationslösung) sehr akkurat war. Es kann bis zu diesem Punkt geschlussfolgert werden, dass zur Induktion von LDCVs in DRG-Neuronen eine hochfrequente Stimulation bei kurzer Pulsdauer benötigt wird. Weiter zeigte sich eine im Vergleich zu publizierten Angaben der Stimulus-Sekretions-Beziehung von SVs [ms] sehr schwache zeitliche Beziehung zwischen Beginn der Stimulation (Ursache) und Sekretion des ersten LDCVs (Wirkung) [s].

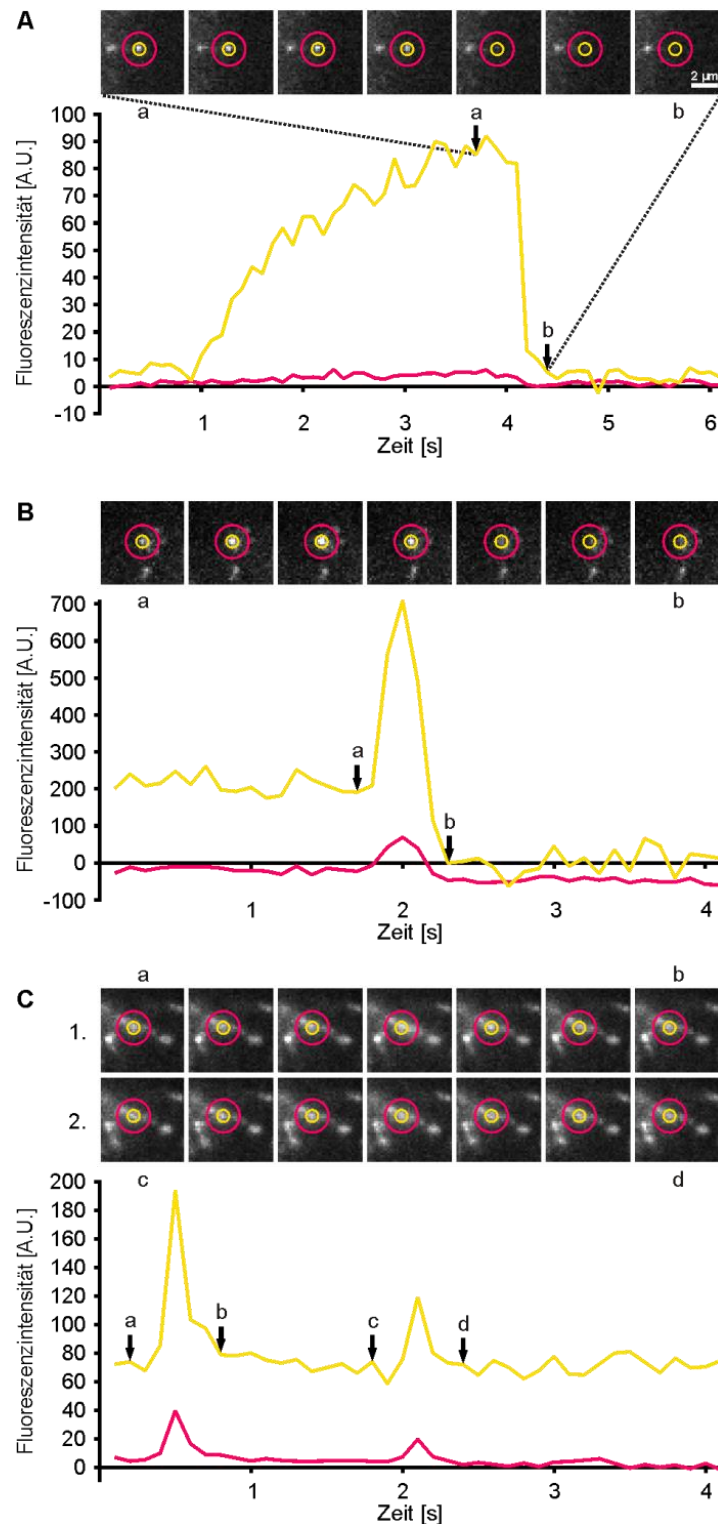
### 3.2. Analyse von Sekretionstypen in DRG-Neuronen

Für die Freisetzung von LDCVs wurden in diversen Zelltypen, wie beispielsweise Mastzellen, Chromaffinzellen der Nebenniere oder PC12 Zellen, verschiedene Typen der Fusion beschrieben (Ales et al., 1999; Bruns, 2004; Spruce et al., 1990). So gibt es einen Fusionstyp, bei dem die Vesikelmembran vollständig mit der Plasmamembran der Zelle verschmilzt und der gesamte Inhalt des Vesikels freigesetzt wird (vollständige Fusion; engl.: „Full Fusion“). Bei einer anderen Art von Fusionsereignis öffnet sich die Fusionspore nur vorübergehend und nur ein Teil des Vesikelinhaltes wird freigesetzt. Anschließend verschließt sich die Fusionspore wieder, das Vesikel löst sich von der Plasmamembran und bewegt sich zurück ins Cytoplasma (Fusionieren und Entfernen, engl.: „Kiss and Run“). Diesem Typ sehr ähnlich ist ein weiterer Fusionstyp, bei dem das Vesikel ebenfalls unvollständig mit der Plasmamembran verschmilzt. Hier bleibt das Vesikel nach Fusion allerdings am Ort der Freisetzung (Fusionieren und Verweilen; engl.: „Kiss and Stay“).

Bei der Durchsicht der TIRFM-Aufnahmen in dieser Arbeit fiel auf, dass auch Exozytoseereignisse von LDCVs in DRG-Neuronen nicht immer auf die gleiche Weise ablaufen. Durch die Benutzung des pH-sensitiven Fluoreszenzproteins Venus, dessen Fluoreszenzintensität in saurem Milieu (pH 5,5 in Vesikeln), teilweise gedämpft und bei Kontakt mit neutralem pH (Extrazellulärraum nach Exozytose pH 7,4) schlagartig erhöht wird, wurde deutlich, dass Exozytose in den Aufnahmen auf verschiedene Arten wahrgenommen werden kann. Zum einen durch eine plötzliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Vesikels, in manchen Fällen zusammen mit dem Auftreten einer fluoreszenten Wolke, die aus dem Vesikel freigesetzt wird. Zum anderen zeigte sich Exozytose durch den plötzlichen Verlust der Fluoreszenz eines Vesikels. Es sollte nun

aufgrund dieser Beobachtungen jedes Fusionsereignis einzeln genauer untersucht werden, um festzustellen, welcher Modus der Exozytose für LDCVs in DRG-Neuronen hauptsächlich genutzt wird. Hierzu wurden die Verläufe der Fluoreszenzintensität einzelner Vesikel und ihrer unmittelbaren Umgebung dargestellt. So konnten drei verschiedene Fusionstypen (s. o.) identifiziert werden (Abbildung 12).

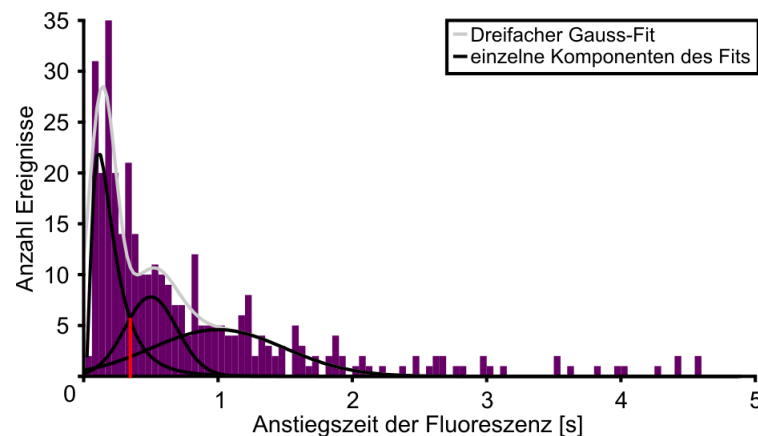
Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzverläufe dreier sezernierter Vesikel. Diese Verläufe zeigen die drei verschiedenen beobachteten Fusionsarten von LDCVs in DRG-Neuronen: „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“. In Abbildung 12 A ist ein Ereignis dargestellt, das als „Full Fusion“-Event klassifiziert wird. Die Kriterien zur Identifikation eines solchen Ereignisses sind ein langsamer Anstieg der Fluoreszenzintensität oder ein konstant hoher Wert der Fluoreszenzintensität vor Fusion während der gesamten Aufnahme und ein plötzlicher Abfall der Fluoreszenzintensität binnen ca. 400 ms bei Fusion. Abbildung 12 B zeigt den Filmausschnitt eines Ereignisses, das als „Kiss and Run“ identifiziert wird. Die Kriterien für die Klassifizierung eines solchen Ereignisses sind ein schneller Anstieg der Fluoreszenzintensität ( $0.16 \pm 0.01$  ms), ein schneller Verlust der Fluoreszenz ( $0.37 \pm 0.05$  ms) und nach Fusion eine Fluoreszenzintensität ähnlich der Hintergrundfluoreszenz. Abbildung 12 C schließlich zeigt ein Ereignis, das als „Kiss and Stay“ identifiziert wird. Dieses Ereignis zeichnet sich im Fluoreszenzverlauf durch einen schnellen Anstieg der Fluoreszenz (siehe „Kiss and Run“), einen schnellen Abfall der Fluoreszenz (siehe „Kiss and Run“) und ein, im Vergleich zu vor der Fusion, gleichbleibendes oder erhöhtes Fluoreszenzniveau nach der Fusion aus.



**Abbildung 12 : DRG-Neurone besitzen verschiedene Modi der Exozytose von LDCVs.** Dargestellt ist jeweils im oberen Teil der Abbildungen eine exemplarische Bildsequenz sezernierter LDCVs. Im unteren Teil sind die zu den jeweiligen Vesikeln gehörigen Verläufe der Fluoreszenzintensität zu sehen. Zur Analyse wurden 2 Regionen um die sezernierten Vesikel gelegt. Eine kleinere Region (gelb) erfasste ausschließlich die Fluoreszenzintensität des Vesikels. Eine zweite, etwas größere Region (rot) sollte, nach Subtraktion der Vesikelregion, die unmittelbare Umgebung des Vesikels erfassen und das Auftreten einer fluoreszenten Wolke anzeigen, die durch Ausschüttung des Vesikelinhaltes erzeugt wird. Die Kleinbuchstaben zeigen an, mit welcher Stelle des Fluoreszenzverlaufes die Bilder des Filmausschnittes korrelieren. A) Stellt ein Exozytoseereignis dar, das als „Full Fusion“ klassifiziert wird. B) Zeigt den Verlauf eines „Kiss and Run“-Ereignisses. C) Zeigt zwei Fusionsereignisse desselben Vesikels unmittelbar nacheinander. Dieser Fusionstyp wird als „Kiss and Stay“ klassifiziert.



Zur Unterscheidung der verschiedenen Fusionstypen wurde die Anstiegszeit der Fluoreszenzintensität als ein Parameter festgelegt. Bei „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ war diese Zeit „kurz“, für „Full Fusion“ hingegen dauerte der Anstieg „länger“. Um den Zeitpunkt zu definieren, der einen schnellen von einem langsamen Anstieg unterscheidet, wurde die Anstiegsdauer der Fluoreszenzintensität aller Exozytoseereignisse grafisch gegen die Häufigkeit ihres Vorkommens aufgetragen und mithilfe eines dreifachen Gauss-Fits gefittet. Es ergeben sich drei Populationen von Anstiegszeiten, wobei die Abgrenzung zwischen den Zeiten unter und über 350 ms, wie in Abbildung 13 dargestellt, am deutlichsten erkennbar ist. Für die softwaregestützte Unterteilung der Fusionsereignisse in „Full Fusion“ und „Kiss and Run“ bzw. „Kiss and Stay“ wurde dieser Wert (rote Markierung) herangezogen.

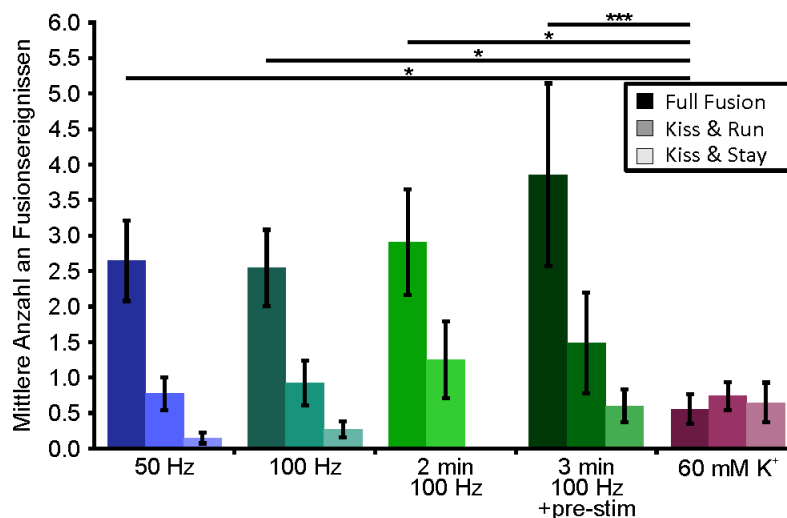


**Abbildung 13:** Exozytoseereignisse können anhand der Anstiegszeit der Fluoreszenz in 2 Kategorien unterteilt werden. Dargestellt sind alle Exozytoseereignisse mit der Anstiegszeit ihrer Fluoreszenzintensität und der Häufigkeit ihres Vorkommens. Diese Werte wurden durch einen dreifachen Gauss-Fit gefittet (hellgraue Linie). Die schwarze Linie zeigt die drei einzelnen Komponenten des Fits. In Rot ist die Überschneidung der Populationen mit einer Anstiegszeit größer bzw. kleiner 350 ms markiert.

Es konnte also gezeigt werden, dass bei Stimulation von DRG-Neuronen verschiedene Arten der Fusion induziert werden, die gemäß Beschreibungen in der Literatur als „Full Fusion“- „Kiss and Run“- und „Kiss and Stay“-Exozytose bezeichnet werden können.

Nachdem geklärt wurde, dass verschiedene Arten der Exozytose in DRG-Neuronen existieren, stellte sich nun die Frage, ob sie zur Freisetzung des Inhaltes ihrer LDCVs einen bestimmten Fusionstypen bevorzugt nutzen und ob die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Typen, wie beispielsweise in Chromaffinzellen (Fulop et al., 2005), abhängig von

der Art und Stärke der Stimulation ist. Daher wurde, wie in Abbildung 14 gezeigt, die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Fusionstypen für alle bereits beschriebenen Stimulationsarten näher untersucht.

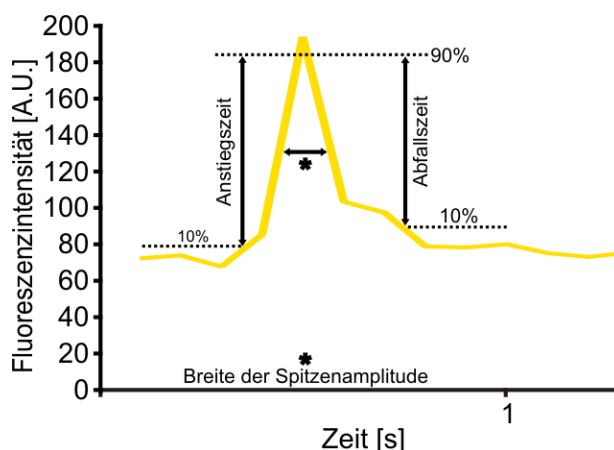


**Abbildung 14: „Full Fusion“-Exozytose ist der vorrangig auftretende Modus der Freisetzung bei Feldelektrodenstimulation.** Bei Stimulation mit 60 mM Kalium treten alle drei Modi der Exozytose mit gleicher Häufigkeit auf. Getestet wurde das Vorkommen von „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ in allen Feldelektrodenstimulationen (50 Hz (blau) n=21, 100 Hz (türkis) n=23, 2 Minuten Langzeit (hellgrün) n=17 und 3 Minuten Langzeit mit niederfrequentem Prästimulus (dunkelgrün) n=17) und in der Stimulation mit 60 mM Kalium (lila) (n=11). Die Fehlerbalken zeigen den SEM, \* zeigen Signifikanzen an (\*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ).

Es zeigte sich (Abbildung 14), dass bei allen Feldelektrodenstimulationen eine klare Präferenz für den Sekretionsmodus „Full Fusion“ vorliegt. Seltener kann der „Kiss and Run“-Modus beobachtet werden und deutlich am seltensten wird der „Kiss and Stay“-Modus von DRG-Neuronen zur Sekretion von LDCVs am Soma genutzt. Für die Stimulation mit einer 60 mM Kaliumlösung sieht die Verteilung des Auftretens der Fusionstypen im Vergleich zur Feldelektrodenstimulation völlig anders aus. Bei der high K<sup>+</sup>-Stimulation tritt der „Full Fusion“-Modus am seltensten auf, während „Kiss and Run“ am häufigsten ist. Generell zeigt sich, im Gegensatz zur Feldelektrodenstimulation, keine deutliche Präferenz für einen bestimmten Sekretionsmodus. Nach Durchführung eines Two-Way ANOVA und eines anschließenden Student-Newman-Keuls Post-hoc-Tests zeigte sich, dass das Vorkommen des „Full Fusion“-Modus zwischen der high K<sup>+</sup>-Stimulation und der Langzeit-Feldelektrodenstimulation mit Prästimulus hoch signifikant unterschiedlich ist ( $P \leq 0,001$ ). Zwischen dem Auftreten von „Full Fusion“ bei high K<sup>+</sup>-Stimulation im Vergleich zu den

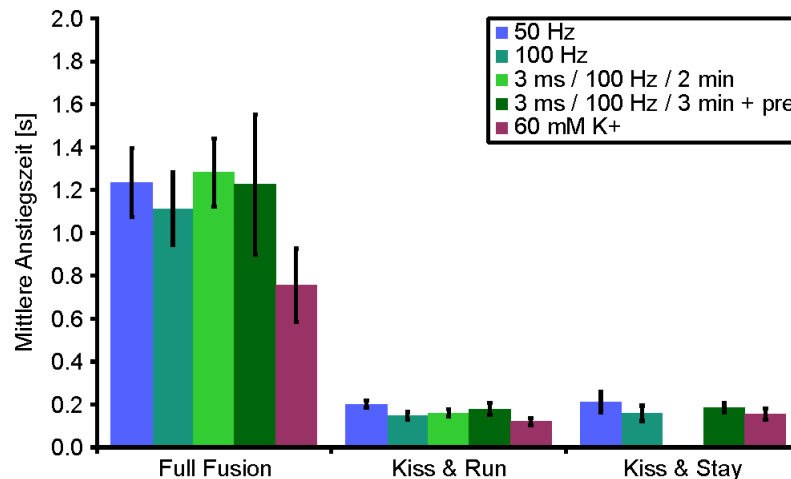
anderen Feldelektrodenstimulationen besteht jeweils ein signifikanter Unterschied (high  $K^+$  vs. 50 Hz:  $P=0,028$ ; high  $K^+$  vs. 100 Hz:  $P=0,013$ ; high  $K^+$  vs. 2 min 100 Hz:  $P=0,029$ ).

Neben der Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Fusionsarten war eine weitere interessante Frage, ob die Art der Stimulation Einfluss auf die Kinetik der Fusionsereignisse hat. Um dies zu testen, wurden verschiedene Parameter aller Fusionsereignisse untersucht. So wurden die Dauer des Anstieges der Fluoreszenz (Zeitspanne zwischen 10 % und 90 % des Maximums), die Dauer zwischen Anstieg (50 %) und Abfall (50 %) (engl.: peak width at half maximum; Breite der Spitzenamplitude) der Fluoreszenz und die Dauer des Abfalls der Fluoreszenz (Zeitspanne zwischen 90 % und 10 % des Maximums) näher untersucht. Abbildung 15 stellt die Definition der untersuchten Parameter grafisch dar.



**Abbildung 15 : Grafische Darstellung untersuchter Parameter der Kinetik von Fusionsereignissen.** Getestete Parameter waren die Anstiegszeit der Fluoreszenzintensität (10 % bis 90 % des Maximums), die Breite der Spitzenamplitude (50 % bis 50 % des Maximums) und die Abfallszeit der Fluoreszenzintensität (90 % bis 10 % des Maximums).

Abbildung 16 zeigt die Anstiegszeiten der Fluoreszenzintensität der verschiedenen Fusionstypen, aufgeschlüsselt nach der jeweiligen Stimulationsart.

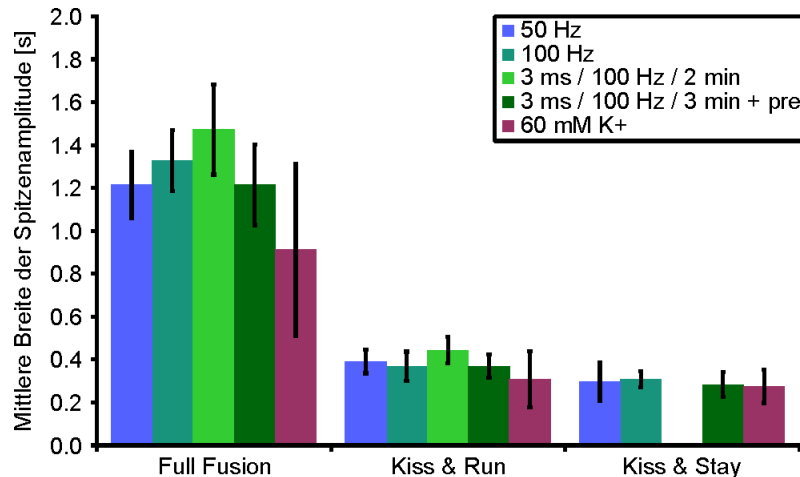


**Abbildung 16 : Die mittlere Anstiegszeit der Fluoreszenzintensität von Exozytoseereignissen verschiedener Fusionstypen unterscheidet sich jeweils nicht signifikant zwischen Stimulationsarten.** Dargestellt ist die mittlere Anstiegszeit der Fluoreszenzintensität von Exozytoseereignissen, unterteilt in die drei Fusionstypen „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“, in 5 verschiedenen Stimulationsarten. Blau zeigt die Werte der 50 Hz Stimulation, Türkis die der 100 Hz Stimulation, Hellgrün die der 2-minütigen Langzeitstimulation, Dunkelgrün die der 3-minütigen Langzeitstimulation mit niederfrequentem Prästimulus und Lila die der Stimulation mit 60 mM Kalium. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Da die Anstiegszeit bereits ein Kriterium der Unterscheidung zwischen „Full Fusion“ und „Kiss and Run“ bzw. „Kiss and Stay“ war und diese Zeit zudem völlig unterschiedliche Schritte der Exozytose widerspiegelt, ist es nicht verwunderlich, dass „Full Fusion“-Ereignisse einen wesentlich länger andauernden Fluoreszenzanstieg zeigen als „Kiss and Run“- und „Kiss and Stay“-Ereignisse. Durchschnittlich haben „Full Fusion“-Ereignisse eine Anstiegszeit von 11,2 s, wohingegen die Anstiegszeit von „Kiss and Run“ 1,6 s und die von „Kiss and Stay“ 1,8 s beträgt. Zwischen den verschiedenen Stimulationsarten sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Die Anstiegszeit der Fluoreszenz kann im Fall von „Full Fusion“ als Dockingzeit betrachtet werden. Im Falle von „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ stellt diese Zeit eher die Zeitspanne bis zur maximalen Öffnung der Fusionspore und der Deprotonierung des LDCV-Lumens dar. Es konnte gezeigt werden, dass diese wichtigen Schritte der Exozytose nicht durch die Stimulationsart verändert werden.

Als nächster Parameter für die Kinetik der Vesikelsekretion wurde die mittlere Breite der Spitzenamplitude untersucht. Diese entspricht der Zeitspanne zwischen den Zeitpunkten, bei denen sowohl der Anstieg als auch der Abfall der Fluoreszenz 50 % des Maximalwertes erreicht haben. Diese Werte spiegeln für „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ die Zeit wider, in der die Fusionspore insgesamt geöffnet ist. Für „Full Fusion“ zeigt sie die Dauer, die Vesikel

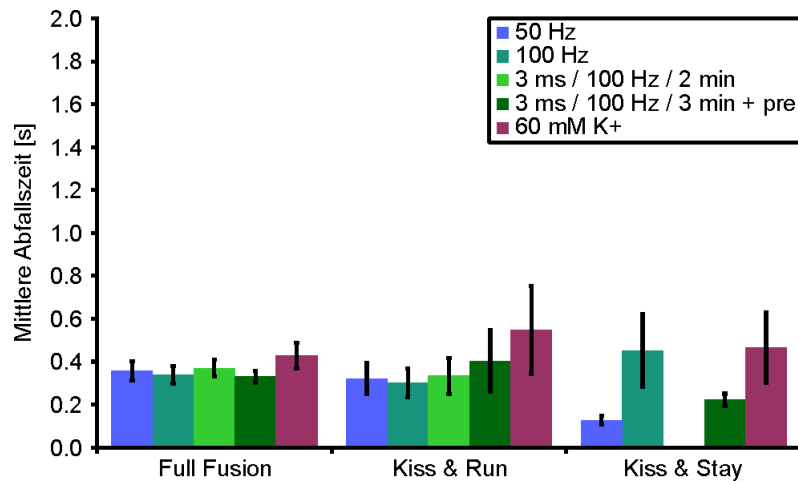
bis zu ihrer Verschmelzung mit der Plasmamembran in einem gedockten Zustand verbringen. Auch diese Werte wurden innerhalb der verschiedenen Fusionstypen auf Unterschiede zwischen den Stimulationsarten untersucht (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Die mittlere Breite der Spitzenamplitude von Exozytoseereignissen verschiedener Fusionstypen unterscheidet sich jeweils nicht signifikant zwischen Stimulationsarten.** Dargestellt ist die mittlere Breite der Spitzenamplitude von Exozytoseereignissen unterteilt in die drei Fusionstypen „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ in 5 verschiedenen Stimulationsarten. Blau zeigt die Werte der 50 Hz Feldelektrodenstimulation, Türkis die der 100 Hz Stimulation, Hellgrün die der 2-minütigen Langzeitstimulation, Dunkelgrün die der 3-minütigen Langzeitstimulation mit niederfrequentem Prästimulus und Lila die der Stimulation mit 60 mM Kalium. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Auch im Vergleich der mittleren Breite der Spitzenamplitude zeigt sich innerhalb der Gruppen der Fusionstypen kein signifikanter Unterschied. Für „Full Fusion“ ist der Wert generell höher als für „Kiss and Run“ bzw. „Kiss and Stay“. Dies ist zu erwarten, da auch diese Werte für „Full Fusion“ einen völlig anderen Schritt der Exozytose widerspiegeln als für „Kiss and Run“ bzw. „Kiss and Stay“. Im Mittel beträgt die Breite der Spitzenamplitude für „Full Fusion“ 1,2 s, für „Kiss and Run“ 0,4 s und für „Kiss and Stay“ 0,3 s.

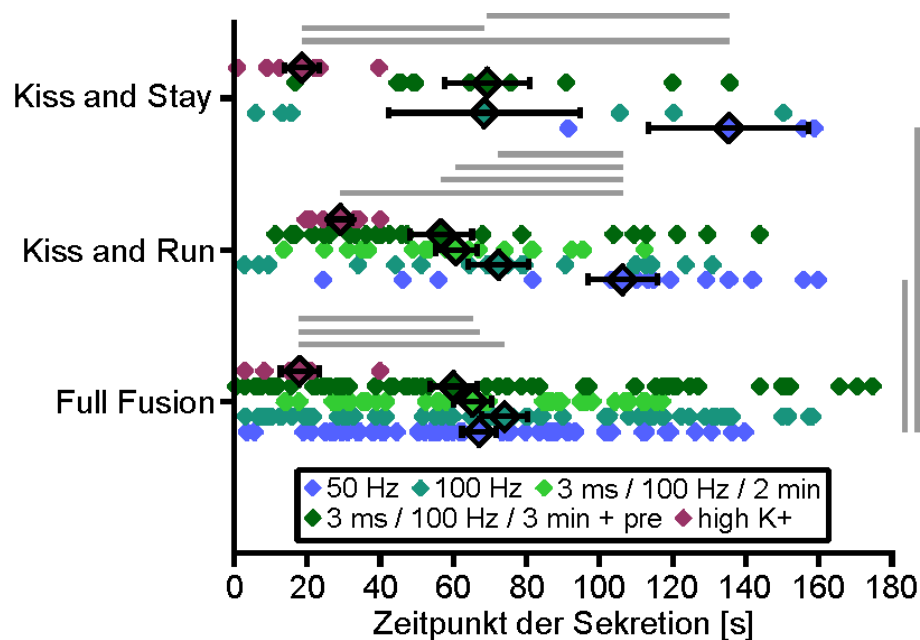
Schließlich wurde für alle Fusionsereignisse noch die Dauer des Fluoreszenzabfalls untersucht (Abbildung 18). Diese stellt für „Kiss and Stay“-Ereignisse die Dauer des Schließens der Fusionspore und der anschließenden Reacidifizierung des Vesikellumens dar, für „Kiss and Run“ schließt sie zusätzlich das Entfernen des Vesikels von der Plasmamembran (engl.: Undocking) ein. Für „Full Fusion“ ist es die Zeit der Freisetzung des gesamten Vesikelinhaltes.



**Abbildung 18: Die mittlere Abfallszeit der Fluoreszenzintensität von Exozytoseereignissen verschiedener Fusionstypen unterscheidet sich jeweils nicht signifikant zwischen Stimulationsarten.** Dargestellt ist die mittlere Abfallszeit der Fluoreszenzintensität von Exozytoseereignissen unterteilt in die drei Fusionstypen „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ in 5 verschiedenen Stimulationsarten. Blau zeigt die Werte der 50 Hz Feldelektrodenstimulation, Türkis die der 100 Hz Stimulation, Hellgrün die der 2-minütigen Langzeitstimulation, Dunkelgrün die der 3-minütigen Langzeitstimulation mit niederfrequentem Prästimulus und Lila die der Stimulation mit 60 mM Kalium. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

In der mittleren Abfallszeit der Fluoreszenz zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Fusionsarten. Die mittlere Abfallszeit für „Full Fusion“ beträgt 3,6 s, die für „Kiss and Run“ 3,8 s und für „Kiss and Stay“ 3,2 s. Auch innerhalb der Fusionstypen zwischen den verschiedenen Stimulationsarten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Abfallszeit der Fluoreszenz.

In Chromaffinzellen ist, wie bereits beschrieben, das Auftreten eines Fusionstyps abhängig von der Stärke der Stimulation und somit in nächster Instanz von der intrazellulären Calciumkonzentration (Elhamdani et al., 2001; Fulop et al., 2005). In Abbildung 9 war zu erkennen, dass zwar alle getesteten Stimulationen einen Calciumeinstrom in DRG-Neurone bewirken, dass jedoch die  $[Ca^{2+}]_i$  trotz Stimulation über die Zeit abfällt. Daraus ergab sich ein weiterer wichtiger Aspekt, den es bei der Vesikelsekretion zu untersuchen galt, nämlich, ob Fusionstypen zu bestimmten Zeitpunkten der Stimulation auftreten. Zur Analyse wurden alle Fusionsereignisse nach Stimulationsart und Fusionstyp aufgeteilt und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 19).



**Abbildung 19 : Fusionstypen treten nicht zu bestimmten Zeitpunkten nach Beginn einer Stimulation auf.**  
 Dargestellt sind die Zeitpunkte des Auftretens aller Exozytoseereignisse, unterteilt nach der Art der Exozytose und der Stimulation. Blau zeigt die Werte der 50 Hz Feldelektrodenstimulation, Türkis die der 100 Hz Stimulation, Hellgrün die der 2-minütigen Langzeitstimulation, Dunkelgrün die der 3-minütigen Langzeitstimulation mit niederfrequentem Prästimulus und Lila die der Stimulation mit 60 mM Kalium. Schwarz umrandete Datenpunkte zeigen den Mittelwert der jeweiligen Gruppe mit SEM. Graue Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen den angezeigten Gruppen.

In Abbildung 19 zeigt sich, dass „Full Fusion“ für alle Feldelektrodenstimulationen etwa 65 s nach Beginn der Stimulation stattfindet, aber auch eine sehr breite Streuung im Zeitpunkt des Auftretens hat. Für die Stimulation mit high  $K^+$  tritt „Full Fusion“ im Vergleich zu den Feldelektrodenstimulationen wesentlich früher auf, was aber teilweise mit der Dauer der Stimulation im Fall von high  $K^+$  erklärt werden kann. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Zeit des Auftretens von „Full Fusion“ bei high  $K^+$ -Stimulation ( $18,0 \pm 5,3$  s) im Vergleich zur 50 Hz ( $67,1 \pm 4,7$  s), 100 Hz ( $74,0 \pm 6,3$  s) und der Langzeit-Feldelektrodenstimulation ( $65,3 \pm 5,3$  s) (jeweils  $P \leq 0,05$ ). Der Unterschied des Zeitpunktes von „Full Fusion“ zwischen high  $K^+$ -Stimulation und Langzeit-Feldelektrodenstimulation mit niederfrequentem Prästimulus ( $60,0 \pm 6,5$  s) ist nicht signifikant. Für den Zeitpunkt des Auftretens von „Kiss and Run“ gibt es zwischen den verschiedenen Stimulationsarten wesentlich größere Unterschiede. So tritt „Kiss and Run“ bei der 50 Hz Stimulation ( $106,3 \pm 9,5$  s) signifikant später auf als bei allen anderen Stimulationsarten (100 Hz:  $72,4 \pm 8,2$  s; Langzeit-Feldelektrodenstimulation:  $60,7 \pm 5,7$  s; Langzeit-Feldelektrodenstimulation mit niederfrequentem Prästimulus:  $56,6 \pm 8,5$  s; high  $K^+$ :  $29,1 \pm 3,0$  s) (jeweils  $P \leq 0,05$ ). Für „Kiss and Stay“ schließlich ist die Streuung des Zeitpunktes

des Auftretens im Vergleich der verschiedenen Stimulationsarten am größten. Mit Abstand am frühesten tritt „Kiss and Stay“ wieder in der high  $K^+$ -Stimulation auf ( $18,6 \pm 4,7$  s). Für die 100 Hz Stimulation liegt der Mittelwert bei  $68,5 \pm 26,2$  s und für die Langzeit-Feldelektrodenstimulation mit niederfrequentem Prästimulus bei  $69,3 \pm 11,7$  s. Für die 50 Hz Stimulation liegt der Wert erneut deutlich am spätesten bei  $135,4 \pm 22,0$  s. Signifikante Unterschiede gibt es zwischen high  $K^+$  und 100 Hz, zwischen high  $K^+$  und 50 Hz und zwischen der Langzeit-Feldelektrodenstimulation mit niederfrequentem Prästimulus und 50 Hz (jeweils  $P \leq 0,05$ ). Wie bereits in Abbildung 14 gezeigt trat in der Langzeit-Feldelektrodenstimulation keine Fusion durch „Kiss and Stay“-Exozytose auf.

Vergleicht man nun innerhalb der einzelnen Stimulationsarten den Zeitpunkt des Auftretens der verschiedenen Fusionstypen, so zeigt sich lediglich in der 50 Hz Stimulation eine deutliche zeitliche Tendenz des Auftretens bestimmter Fusionstypen. Innerhalb aller anderen Stimulationsarten treten die Fusionstypen zu keinem bestimmten Zeitpunkt der Stimulation auf. Für die 50 Hz Feldelektrodenstimulation ergibt sich, dass „Full Fusion“ am frühesten bei  $67,1 \pm 4,7$  s, „Kiss and Run“ bei  $106,3 \pm 9,5$  s und „Kiss and Stay“ deutlich am spätesten bei  $135,4 \pm 22,0$  s auftritt. Signifikante Unterschiede zeigen sich allerdings nur zwischen „Full Fusion“ und „Kiss and Run“ bzw. „Full Fusion“ und „Kiss and Stay“. Auf signifikante Unterschiede wurde innerhalb der Fusionstyp-Gruppen und innerhalb der Stimulationsart-Gruppen mit einem One-Way ANOVA getestet.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass keiner der Fusionstypen zu einem bestimmten Zeitpunkt einer Stimulation auftritt und dass dieser Zeitpunkt nicht von der Art der Stimulation beeinflusst wird.

In diesem Teil der Arbeit konnten drei verschiedene Arten der Exozytose von LDCVs am Soma von DRG-Neuronen, nämlich „Full Fusion“- , „Kiss and Run“- und „Kiss and Stay“-Exozytose, identifiziert werden. Die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Sekretionstypen ist von der Art der Stimulation abhängig. So ist für alle Feldelektrodenstimulationen die „Full Fusion“-Exozytose der am häufigsten verwendete Fusionstyp, „Kiss and Stay“ hingegen wird am seltensten von den Neuronen zur Freisetzung des LDCV-Inhaltes verwendet. Stimuliert man die DRG-Neurone hingegen mit einer 60 mM Kaliumlösung, gibt es keine Präferenz für einen bestimmten Fusionstyp. Alle drei Typen treten in etwa gleich häufig auf und die Häufigkeit des Auftretens der „Full Fusion“-Exozytose ist im Vergleich zur

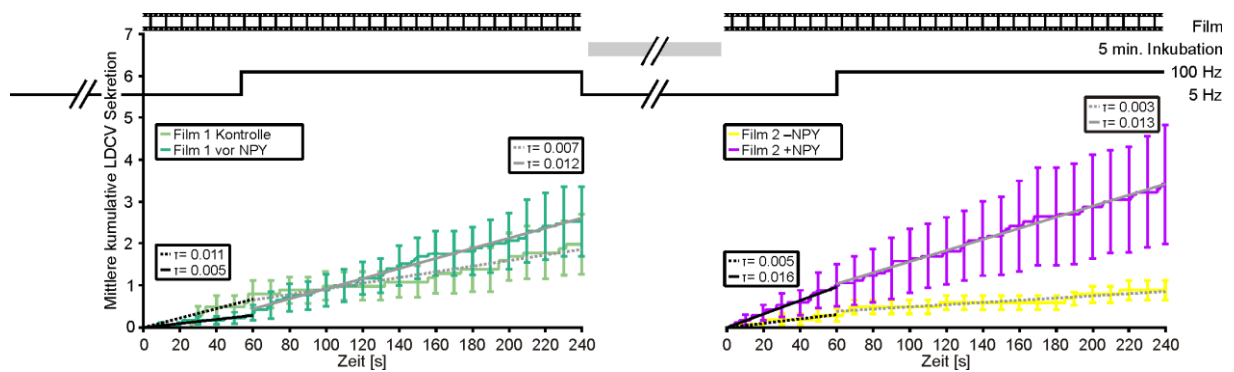


Feldelektrodenstimulation drastisch reduziert. Die Kinetik verschiedener Schritte der Exozytose wie Dockingzeit oder Dauer des Öffnens bzw. Schließens der Fusionspore wird durch die Stimulationsart nicht verändert. Es zeigte sich weiterhin, dass es für das Auftreten eines bestimmten Fusionstyps keinen bevorzugten Zeitpunkt bei Stimulation gibt und dass dieser Zeitpunkt unabhängig von der Stimulationsart ist.

### **3.3. Modulation der Sekretion von LDCVs durch NPY**

Nachdem in dieser Arbeit geklärt werden konnte, dass zur Einleitung der Exozytose von LDCVs am Soma von DRG-Neuronen eine Stimulation bei hoher Frequenz benötigt wird und dass für die Freisetzung des Inhaltes der LDCVs verschiedene Typen der Fusion existieren, ergab sich eine weitere interessante Frage: Besitzt der Inhalt von LDCVs in DRG-Neuronen eine autoregulatorische Funktion auf seine eigene Freisetzung? Diese Frage ist von Bedeutung, da LDCVs in peptidergen DRG-Neuronen für die Freisetzung neuromodulatorischer Substanzen verantwortlich sind. Der Einfluss dieser Neuromodulatoren auf die synaptische Reizweiterleitung wurde bisher mehrfach gezeigt, auch eine Expression von Rezeptoren verschiedener Neuromodulatoren an mehreren Stellen von DRG-Neuronen wurde nachgewiesen. Ein möglicher auto- oder parakriner Einfluss von Neuromodulatoren auf ihre eigene Freisetzung, der sich aus den bisherigen Beobachtungen ergibt, wurde jedoch noch nicht untersucht. NPY ist solch ein Neuromodulator, welcher in einigen DRG-Neuronen endogen exprimiert und dem eine modulatorische Rolle in der Schmerzwahrnehmung zugeschrieben wird (Bleakman et al., 1991; Walker et al., 1988).

Zur Beantwortung der Frage nach dem Effekt von NPY auf die Freisetzung von LDCVs wurden Experimente mit TIRFM durchgeführt, bei denen DRG-Neurone in 0,05  $\mu$ M NPY-Lösung inkubiert wurden. Es wurde zunächst untersucht, ob NPY einen Einfluss auf die Anzahl freigesetzter LDCVs besitzt (Abbildung 20).

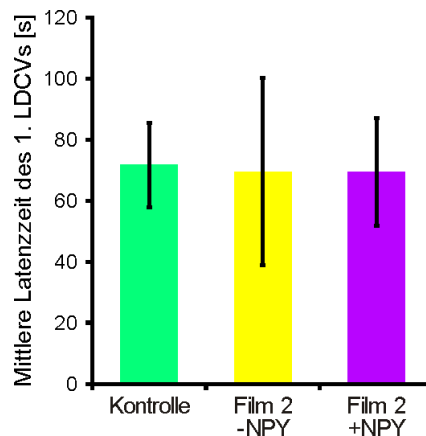


**Abbildung 20: NPY sensibilisiert DRG-Neurone für niederfrequente Stimulationen.** Aufgetragen ist die mittlere kumulative LDCV-Sekretion gegen die Zeit, in Kontrollzellen ohne jegliche NPY-Applikation (Hellgrün: Film 1 Kontrolle; Gelb: Film 2 –NPY jeweils  $n=10$ ) und in Zellen vor und nach NPY-Applikation (Türkis: Film 1 vor NPY; Lila: Film 2 +NPY jeweils  $n=17$ ). Über den Graphen ist das Messprotokoll abgebildet. Es zeigt zunächst eine 3-minütige Stimulation der Neurone mit einem 5 Hz Prästimulus. Daran schließt sich der Beginn der TIRFM-Aufnahme unmittelbar an. Während dieser Aufnahme wird nach 1 Minute der niederfrequente Stimulus in einen hochfrequenten 100 Hz Stimulus geändert, welcher 3 min bis zum Ende der TIRFM-Aufnahme appliziert wird. Dann folgt eine 5-minütige Inkubation in  $0,05 \mu\text{M}$  NPY-Lösung bzw. in Kontrolllösung ohne NPY, während der kontinuierlich der 5 Hz Stimulus appliziert wird. Schließlich startet eine weitere 4-minütige TIRFM-Aufnahme, in der erneut nach 1 Minute vom niederfrequenten zum hochfrequenten Stimulus gewechselt wird. In den Graphen ist des Weiteren die Steigung in verschiedenen Abschnitten der Kurven ( $\tau$ ) dargestellt und die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Abbildung 20 zeigt die gemittelte kumulative LDCV-Sekretion von DRG-Neuronen. Im linken Graphen werden Kurven der ersten TIRFM-Aufnahmen von Zellen, die zum Zeitpunkt der Aufnahmen gleichbehandelt wurden, verglichen. Man kann sehen, dass der Verlauf der Kurven erwartungsgemäß sehr ähnlich ist. In den Zellen vor NPY-Inkubation ist die Rate der sezernierten Vesikel über die Zeit bei Stimulation mit dem hochfrequenten Stimulus ( $\tau=0,012$  LDCVs/s) leicht, aber nicht signifikant höher als in Kontrollzellen ( $\tau=0,007$  LDCVs/s). Während des niederfrequenten Prästimulus hingegen ist die Rate in Kontrollzellen höher als in Zellen vor NPY-Inkubation. Im rechten Graphen, in dem Zellen nach Inkubation in Kontrolllösung bzw. in  $0,05 \mu\text{M}$  NPY verglichen werden, ist ein deutlicher Unterschied im Verlauf der Graphen zu sehen. So ist zum einen die durchschnittliche Menge an sezernierten LDCVs nach Inkubation mit NPY 3,8-mal höher als ohne die Zugabe von NPY. Ein weiterer wichtiger Effekt, der sich durch NPY zeigt, ist, dass nach NPY Inkubation gut 3-mal mehr LDCVs bereits bei dem niederfrequenten Stimulus sezerniert werden ( $\tau=0,016$  LDCVs/s), im Vergleich zu Kontrollzellen ( $\tau=0,005$  LDCVs/s). Auch im Vergleich der Sekretionsrate bei 5 Hz Stimulation vor und nach NPY-Zugabe zeigt sich dieser Effekt. Auch hier haben die Zellen in der Behandlung vor NPY-Zugabe eine Rate von  $\tau=0,005$  LDCVs/s, nach NPY-Inkubation  $\tau=0,016$  LDCVs/s. Die Kontrollzellen ohne NPY-Inkubation zeigen diesen Effekt nicht. Hier ist

die Rate der Sekretion in der Kontrollsituation (Film 1 Kontrolle) mit  $\tau=0,011$  LDCVs/s sogar höher als nach der Inkubationszeit in Extrazellulärlösung ( $\tau=0,005$  LDCVs/s). Des Weiteren sieht man, dass, obwohl die Rate in den Kontrollzellen nach Inkubation und bei Stimulation mit dem niederfrequenten Stimulus bereits relativ gering ist ( $\tau=0,005$  LDCVs/s), sie bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz auf 100 Hz sogar noch kleiner wird ( $\tau=0,003$  LDCVs/s). Dieses Verhalten ist in den mit NPY inkubierten Zellen nicht zu beobachten, hier bleibt die Rate bei 5 Hz Stimulation ( $\tau=0,016$  LDCVs/s) nach dem Wechsel zum hochfrequenten 100 Hz Stimulus mit  $\tau=0,013$  LDCVs/s fast gleich. Obwohl die gerade beschriebenen Effekte deutlich zu erkennen sind, konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass NPY tatsächlich einen Effekt auf die LDCV-Sekretion besitzt. Es führt zum einen zu einer erhöhten LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen, zum anderen sensibilisiert es die Neurone dahin gehend, dass bereits bei einer niederfrequenten Stimulation, bei der normalerweise kaum LDCV-Sekretion beobachtet werden konnte (zum Vergleich siehe auch Abbildung 10 C und Abbildung 20), eine maximale Sekretionsrate gemessen werden kann. Weiterhin zeigt sich, dass die Zellen eine robustere Sekretion der LDCVs über die Zeit besitzen. Im Gegensatz zu Kontrollzellen kommt es in Zellen nach NPY-Inkubation nicht zu einer Verminderung der Anzahl freigesetzter LDCVs. NPY ermöglicht den Neuronen also auch über einen längeren Zeitraum die konstante Freisetzung von LDCVs.

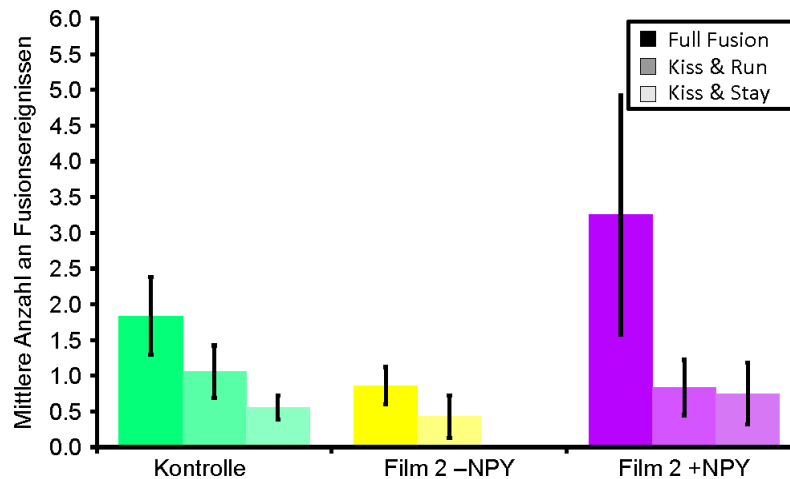
Weiter wurde untersucht, ob NPY neben der Erhöhung der Gesamtsekretion und erhöhter Freisetzbarkeit von LDCVs bei niederfrequenter Stimulation auch die Latenzzeit des ersten sezernierten Vesikels nach Beginn der 100 Hz Stimulation beeinflusst. Alle Zellen der ersten Stimulationsrunde, also vor Inkubation, wurden für die folgenden Analysen als „Kontrolle“ zusammengefasst, da diese zum einen experimentell exakt gleichbehandelt wurden und sich zum anderen bei einer zunächst getrennten Analyse von Zellen vor NPY-Inkubation bzw. vor Inkubation in Kontrolllösung keine Unterschiede feststellen ließen, die eine Zusammenfassung dieser Zellen für die Analyse ausgeschlossen hätten.



**Abbildung 21 : NPY beeinflusst die mittlere Latenzzeit des ersten sezernierten Vesikels nicht.** Dargestellt ist die mittlere Latenzzeit des ersten sezernierten Vesikels nach Beginn der 100 Hz Langzeit-Feldelektrodenstimulation. Grün zeigt die Werte der Kontrollgruppe (n=16), Gelb die der Applikation von Kontrolllösung (n=5) und Lila die der NPY-Applikation (n=11). Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Abbildung 21 zeigt, dass in allen Gruppen die Latenzzeit der Sekretion des ersten LDCVs nach Beginn der hochfrequenten 100 Hz Stimulation fast identisch ist. Der Mittelwert aller Gruppen beträgt  $70,5 \pm 10$  s und die Einzelwerte der Gruppen sind mit diesem fast identisch (Kontrolle:  $71,6 \pm 13,8$  s; Film 2 -NPY:  $69,5 \pm 30,6$  s; Film 2 +NPY:  $69,4 \pm 17,7$  s). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Generell bestätigen diese Daten noch einmal, dass die zeitliche Beziehung zwischen Stimulation und dem Auslösen von LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen sehr schwach ist. Es kann gesagt werden, dass NPY zwar die Rate der LDCV-Sekretion erhöht, jedoch nicht dazu führt, dass Vesikel auf eine starke, hochfrequente Stimulation hin früher freigesetzt werden.

Nachdem beobachtet wurde, dass NPY die Gesamtzahl sezernierter LDCVs erhöht und die Neurone sensibler auf niederfrequente Stimulation mit der Freisetzung von LDCVs reagieren, war es nun interessant zu untersuchen, ob nicht nur mehr LDCVs sezerniert werden, sondern auch mehr Inhalt aus diesen freigesetzt wird. Diese Information kann aus der Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Fusionstypen abgeleitet werden, da bei „Full Fusion“ der gesamte Inhalt von Vesikeln in den extrazellulären Raum freigegeben wird, bei „Kiss and Run“ bzw. „Kiss and Stay“ hingegen nur ein Teil des Vesikelinhaltes aus der kurz geöffneten Fusionspore austreten kann.



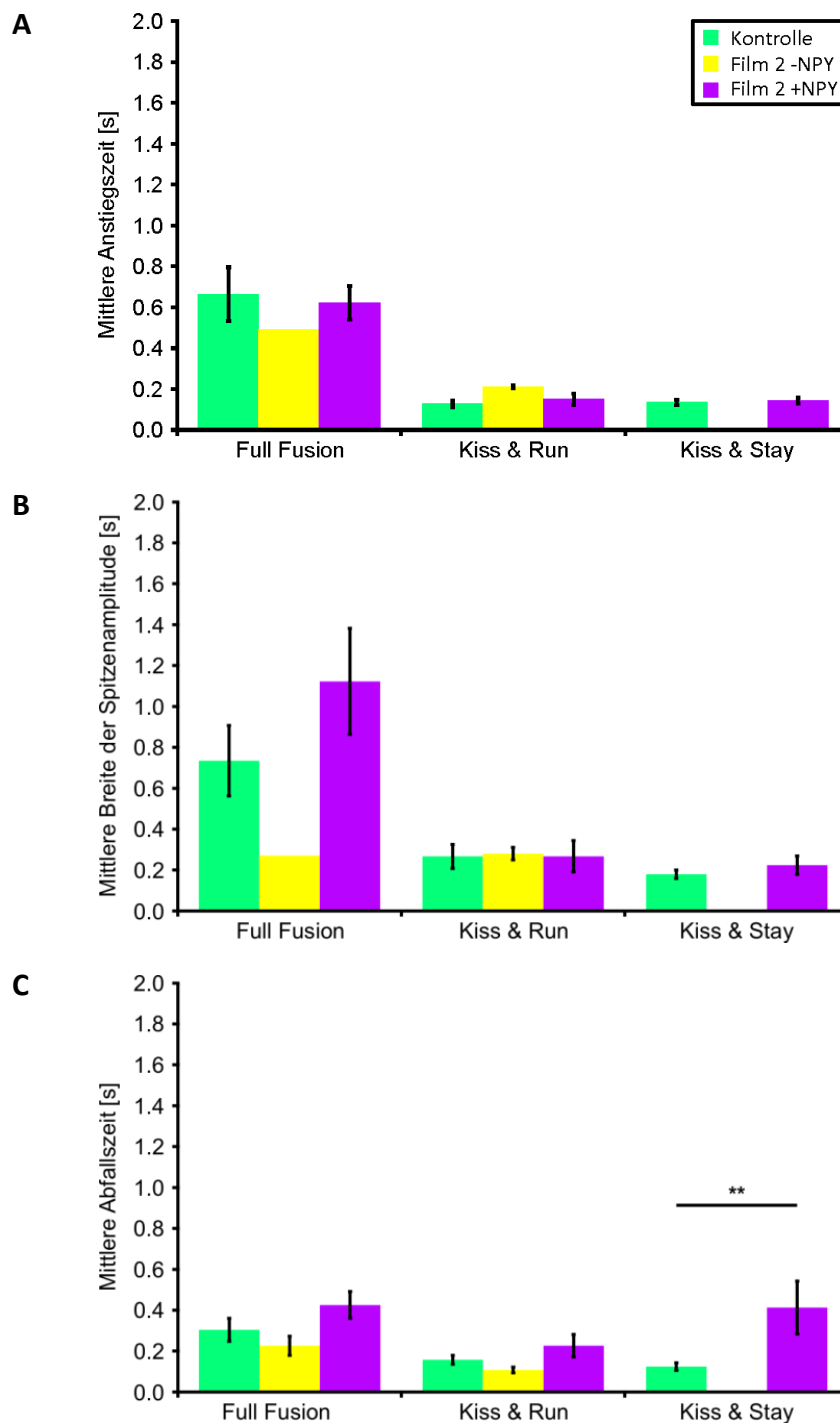
**Abbildung 22: NPY hat keinen Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Fusionstypen.**

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung des Auftretens verschiedener Fusionstypen in unterschiedlich behandelten Gruppen von Neuronen. Getestet wurde das Vorkommen von „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ in Kontrollzellen (grün, n=18), in Zellen nach Inkubation in Kontrolllösung (gelb, n=7) und in Zellen nach Inkubation mit 0,05  $\mu$ M NPY (lila, n=12). Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Abbildung 22 zeigt die Häufigkeitsverteilung des Auftretens von „Full Fusion“- „Kiss and Run“- und „Kiss and Stay“-Exozytose in Kontrollzellen (Zusammenfassung der Zellen aus Abbildung 20 linke Seite) und in Zellen nach Applikation von Kontroll- bzw. 0,05  $\mu$ M NPY-Lösung. Durch Zugabe von NPY wird das Verhältnis von „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ nicht verändert. In jeder der drei getesteten Gruppen wird die „Full Fusion“-Exozytose am häufigsten von allen drei Fusionstypen genutzt, „Kiss and Run“ am zweithäufigsten und „Kiss and Stay“ am seltensten. Diese Tendenz der Häufigkeitsverteilung war bereits in Abbildung 14 zu sehen. Obwohl NPY den Anteil von „Full Fusion“, im Vergleich zu den anderen Gruppen, zu erhöhen scheint, ist diese Erhöhung aufgrund des großen Standardfehlers nicht signifikant. Betrachtet man Abbildung 22 in Verbindung mit den in Abbildung 20 gezeigten Daten, so ist es möglich zu sagen, dass die Vesikel, die durch NPY mehr freigesetzt wurden, möglicherweise dem Typ der „Full Fusion“ Exozytose zuzuordnen sind.

Als Nächstes wurde, wie bereits in Teil 3.2. beschrieben, untersucht, ob die Kinetik bzw. die Dauer bestimmter Schritte der Exozytose durch die Applikation von NPY beeinflusst wird. Neben der Häufigkeit des Auftretens bestimmter Fusionstypen kann eine Zelle die Menge an sezerniertem LDCV-Inhalt, im Fall von DRG-Neuronen also die Menge an freigesetzten Neuromodulatoren, durch beispielsweise die Dauer der Öffnung der Fusionspore regulieren. Auch hier bestünde also potenziell die Möglichkeit der Autoregulation durch NPY.

Abbildung 23 fasst die Werte für die mittlere Anstiegszeit, die mittlere Breite der Spitzenamplitude und die mittlere Abfallszeit der Fluoreszenzintensität zusammen.



**Abbildung 23 : Bis auf die Verzögerung des Schließens der Fusionspore in „Kiss and Stay“-Ereignissen hat NPY keinen Einfluss auf die Kinetik verschiedener Fusionstypen.** Die Graphen zeigen den Vergleich dreier verschiedener Messgruppen (Grün: Kontrollgruppe, Gelb: Applikation von Kontrolllösung, Lila: NPY-Applikation), unterteilt in die drei Fusionstypen „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“. A) Vergleich der mittleren Anstiegszeit der Fluoreszenzintensität aller Exozytoseereignisse. B) Vergleich der mittleren Breite der Spitzenamplitude aller Exozytoseereignisse. C) Vergleich der mittleren Abfallszeit der Fluoreszenzintensität aller Exozytoseereignisse. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, \* zeigen Signifikanzen an (\*\*: P ≤ 0,01).

In Abbildung 23 A ist zu erkennen, dass die mittlere Anstiegszeit in allen Gruppen für die jeweiligen Fusionstypen gleich ist. Für „Full Fusion“ beträgt die mittlere Anstiegszeit der Fluoreszenz ca. 0,6 s für „Kiss and Run“ 0,2 s und für „Kiss and Stay“ 0,1 s. Die Werte der einzelnen Behandlungsgruppen („Full Fusion“ Kontrolle:  $0,7 \pm 0,1$  s, Film 2 –NPY: 0,5 s und Film 2 +NPY:  $0,6 \pm 0,1$  s; „Kiss and Run“ Kontrolle:  $0,13 \pm 0,02$  s, Film 2 –NPY:  $0,21 \pm 0,01$  s und Film 2 +NPY:  $0,15 \pm 0,03$  s; „Kiss and Stay“ Kontrolle:  $0,13 \pm 0,01$  s und Film 2 +NPY:  $0,14 \pm 0,01$  s) weichen nicht signifikant von den Mittelwerten ab. NPY hat also keinen Einfluss auf die Docking Zeit bei „Full Fusion“ bzw. die Öffnungsdauer der Fusionspore bei „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“.

Abbildung 23 B zeigt, dass NPY auch keinen Einfluss auf die mittlere Breite der Spitzenamplitude zu haben scheint. Für „Full Fusion“ beträgt diese im Mittel 0,7 s, für „Kiss and Run“ 0,3 s und für „Kiss and Stay“ 0,2 s. Keiner der Werte weicht signifikant von diesen Mittelwerten ab („Full Fusion“ Kontrolle:  $0,7 \pm 0,2$  s, Film 2 –NPY: 0,3 s und Film 2 +NPY:  $1,1 \pm 0,3$  s; „Kiss and Run“ Kontrolle:  $0,27 \pm 0,06$  s, Film 2 –NPY:  $0,28 \pm 0,03$  s und Film 2 +NPY:  $0,27 \pm 0,07$  s; „Kiss and Stay“ Kontrolle:  $0,18 \pm 0,02$  s und Film 2 +NPY:  $0,22 \pm 0,05$  s). NPY beeinflusst also weder die Zeit, die Vesikel bei „Full Fusion“-Exozytose gedockt sind, bis sie mit der Plasmamembran verschmelzen, noch die Dauer, in der die Fusionspore in „Kiss and Run“- und „Kiss and Stay“-Ereignissen geöffnet ist.

Schließlich zeigt Abbildung 23 C die Dauer des Fluoreszenzabfalls der, in diesen Experimenten, sezernierten Vesikel. Dieser Wert entspricht für „Full Fusion“-Ereignisse der Dauer der Freisetzung des gesamten Vesikelinhaltes, in „Kiss and Stay“-Ereignissen ist es die Dauer des Schließens der Fusionspore und des Wiederansäuerns des Vesikel-Lumens und in „Kiss and Run“ umfasst er die Zeitspanne des Schließens der Fusionspore, der Reacidifizierung des Vesikel-Lumens und der Entfernung des Vesikels von der Plasmamembran in Richtung Cytosol. Innerhalb der „Full Fusion“-Ereignisse beträgt die mittlere Dauer des Fluoreszenzabfalls 0,3 s und ist in allen drei Behandlungsgruppen gleich. Für „Kiss and Run“ beträgt der Mittelwert 0,2 s und auch hier weichen die einzelnen Werte der jeweiligen Gruppe nicht signifikant von diesem ab. Da, wie bereits in den vorherigen Graphen zu sehen, für die Zellen nach Inkubation mit Kontrolllösung keine „Kiss and Stay“-Ereignisse beobachtet werden konnten, werden für diesen Fusionstyp nur Kontrollzellen mit Zellen nach Inkubation mit NPY verglichen. Der Mittelwert für „Kiss and Stay“ beträgt 0,3 s, hier unterscheiden sich die jeweiligen Werte der Gruppen signifikant voneinander („Full

**Fusion“** Kontrolle:  $0,3 \pm 0,1$  s, Film 2 –NPY:  $0,2 \pm 0,05$  s und Film 2 +NPY:  $0,4 \pm 0,1$  s; **„Kiss and Run“** Kontrolle:  $0,16 \pm 0,02$  s, Film 2 –NPY:  $0,11 \pm 0,01$  s und Film 2 +NPY:  $0,23 \pm 0,05$  s; **„Kiss and Stay“** Kontrolle:  $0,12 \pm 0,02$  s und Film 2 +NPY:  $0,41 \pm 0,13$  s). Für „Kiss and Stay“ in Zellen nach Inkubation mit NPY dauert das Schließen der Fusionspore mit  $0,41 \pm 0,13$  s deutlich länger als in Kontrollzellen ( $0,12 \pm 0,02$  s). Dies bedeutet, dass NPY in diesem Fusionstyp zu einer verstärkten Sekretion von Neuromodulatoren beiträgt.

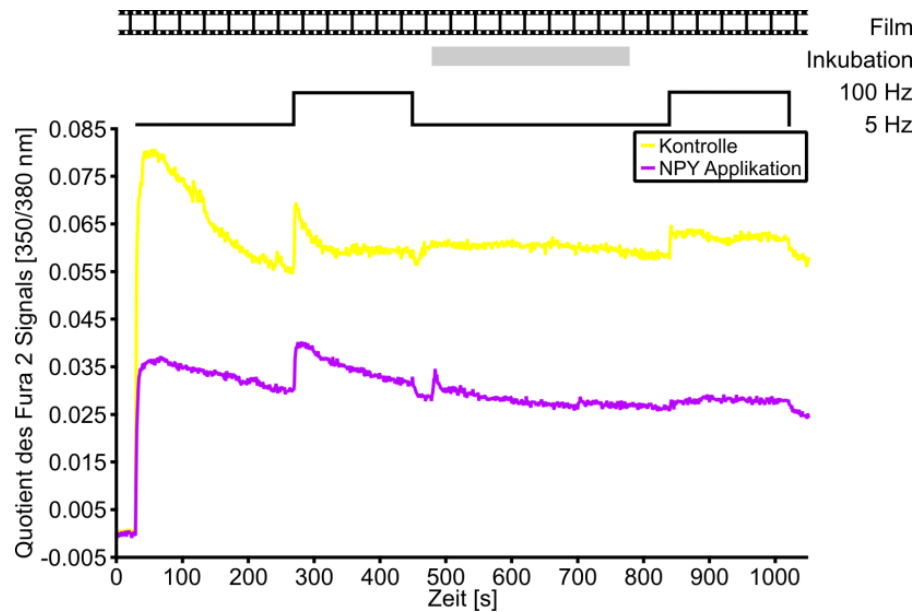
In diesem Teil wurde gezeigt, dass NPY die Sekretion von LDCVs am Soma von DRG-Neuronen beeinflussen kann. So wird durch Applikation von  $0,05 \mu\text{M}$  NPY die Freisetzung von LDCVs erhöht und die Neurone reagieren sensibler auf schwächere (niederfrequente) Stimulationen. Bis auf eine Verlängerung der Schließdauer der Fusionspore in „Kiss and Stay“-Ereignissen scheint NPY keinen Effekt auf die Kinetik der einzelnen Fusionsereignisse zu haben. So sind alle untersuchten Parameter der Exozytose wie Anstiegszeit der Fluoreszenz, mittlere Breite der Spitzenamplitude, Dauer des Fluoreszenzabfalls und Latenzzeit des ersten Vesikels unbeeinflusst.

### 3.4. Aufklärung des Mechanismus der Modulation durch NPY

Nachdem ein sensibilisierender Effekt von NPY auf die Sekretion von LDCVs aus DRG-Neuronen nachgewiesen werden konnte, sollte im letzten Teil dieser Arbeit schließlich eruiert werden, durch welchen Mechanismus NPY diesen Effekt vermittelt.

Neben einer calciumunabhängigen gibt es in DRG-Neuronen eine calciumabhängige Exozytose von LDCVs (Huang und Neher, 1996; Zhang und Zhou, 2002). Da beobachtet wurde, dass durch die Applikation des Neuromodulators NPY die Rate der Sekretion von LDCVs verändert wird, ist eine mögliche Erklärung für diesen Effekt dementsprechend eine Veränderung des Calciumeinstroms während der Stimulation (Bleakman et al., 1991; Endoh et al., 2012; Walker et al., 1988). Diese Hypothese wurde zunächst in Calcium-Imaging-Experimenten getestet. Es wurden 1050 s lange Filme aufgenommen und der Verlauf des Calciumsignals zwischen Zellen mit und ohne NPY-Inkubation verglichen (Abbildung 24).



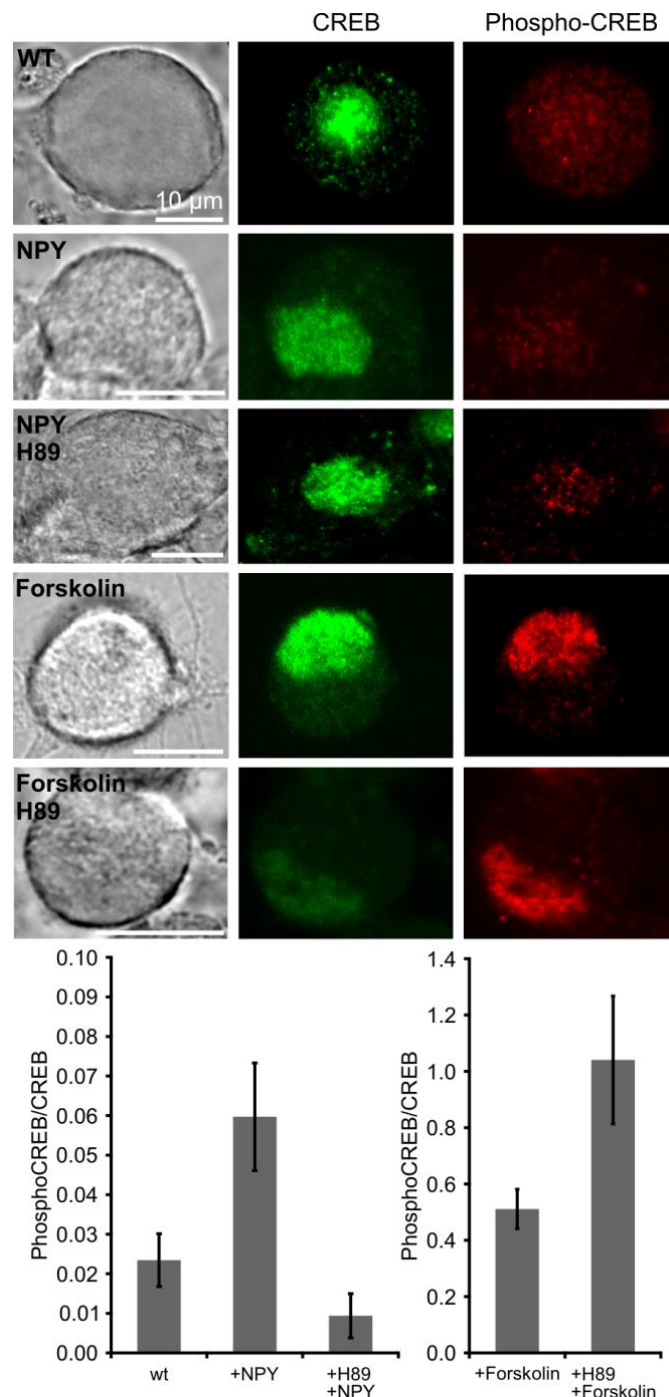


**Abbildung 24 : NPY hat keinen Einfluss auf die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  bei Stimulation.** Dargestellt ist der Vergleich der Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  in DRG-Neuronen bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen in Zellen, die während der Messung in Kontrolllösung (Gelb, n=32) oder 0,05  $\mu$ M NPY-Lösung (Lila, n=35) inkubiert wurden. Es wurden Filme von 1050 s Länge aufgenommen, wobei in den ersten 30 s keine Stimulation stattfand. In dem Zeitfenster zwischen 30 s und 270 s nach Beginn der Aufnahme wurde der niederfrequente 5 Hz Stimulus appliziert. Daran schloss sich unmittelbar eine 3-minütige 100 Hz Stimulation an. Dieser folgte eine 6,5-minütige 5 Hz Stimulation, wobei zwischen 480 s und 780 s nach Beginn der Aufnahme zusätzlich entweder NPY oder extrazelluläre Kontrolllösung appliziert wurde. Von 840 s bis 1020 s wurde die Frequenz der Stimulation erneut auf 100 Hz erhöht und von 1020 s bis 1050 s lief die Aufnahme ohne jegliche Stimulation.

Abbildung 24 zeigt, dass sich die Verläufe des Calciumsignals bei Stimulation in Zellen mit bzw. ohne NPY-Applikation sehr ähneln. Das einzig Auffallende ist, dass der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Kontrollzellen bei der ersten 5 Hz Stimulation stärker ist als in Zellen mit NPY-Applikation. Im weiteren Verlauf der Graphen, also nach NPY-Applikation bzw. Inkubation in Kontrolllösung, ist deren Verlauf sehr ähnlich. Es ist eine kleine Erhöhung des Signals unmittelbar zum Zeitpunkt der NPY-Applikation zu sehen, allerdings ist auch in Kontrollzellen, wenn auch weniger, solch eine minimale Erhöhung vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass durch die Applikation der verschiedenen Lösungen selbst dehnungsaktivierte Natriumkanäle geöffnet wurden, die eine leichte Depolarisation der Neurone erzeugten, somit zur Aktivierung von VDCCs führten und so eine kleine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgte. Anhand dieser Messungen ist nicht eindeutig zu sagen, ob NPY selbst einen Calciumeinstrom bewirkt oder den Calciumeinstrom in die Zelle moduliert. Die erhöhte Sekretionsrate nach NPY-Applikation kann durch die gezeigten Calciummessungen nicht schlüssig erklärt werden.

Von Endoh et al. (2012) wurde in Neuronen des submandibularen Ganglions gezeigt, dass NPY die Aktivität von L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanälen fördert, indem die  $G\alpha_s$  Untereinheit eines G-Protein gekoppelten Rezeptors die Adenylatcyclase (AC) aktiviert, wodurch die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert wird. cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA) und diese phosphoryliert im beschriebenen Fall L-Typ Calciumkanäle und führt so zu deren Öffnung. Calciumkanäle stellen allerdings nur eines von vielen Zielproteinen der PKA dar. Zur Untersuchung, ob auch in DRG-Neuronen eine Aktivierung des AC-PKA-Signalweges durch NPY stattfindet, wurde, als Nachweis für die Aktivität der PKA, die Phosphorylierung eines ihrer Haupt-Zielproteine, des „cAMP response element-binding“ (CREB)-Proteins, in immuncytochemischen Färbungen untersucht. CREB befindet sich im Nukleus der Zellen, wo es nach Phosphorylierung durch PKA ein Homodimer bildet, welches an die CRE-Sequenz bestimmter Promotoren binden kann und so die Transkription der entsprechenden Gene verstärkt. Wird also der cAMP-Signalweg durch NPY aktiviert, so würde man in Färbungen gegen CREB und dessen phosphorylierte Form (PhosphoCREB) nach Zugabe von NPY ein stärkeres PhosphoCREB-Signal erwarten. Neben der Inkubation mit NPY wurden jeweils Zellen der gleichen Präparation mit Forskolin, einem Aktivator der AC, inkubiert und dienten somit als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit H-89, einem Inhibitor der PKA (Yuan und Bers, 1995).

Abbildung 25 zeigt Durchlichtaufnahmen von DRG-Neuronen mit den entsprechenden Immunfluoreszenzfärbungen gegen CREB und PhosphoCREB in den jeweils angezeigten Behandlungsgruppen. Die Balkendiagramme zeigen die Quantifizierung des Verhältnisses von PhosphoCREB zu CREB.

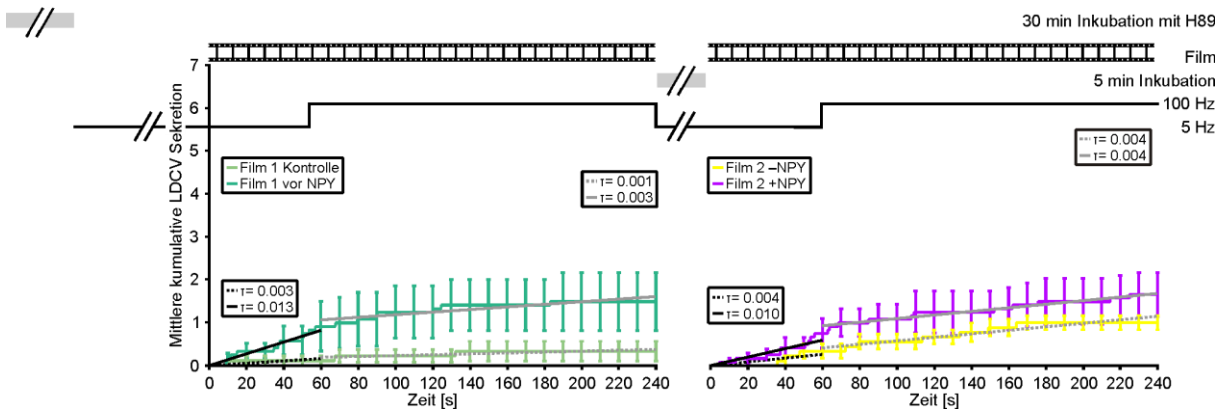


**Abbildung 25 : NPY aktiviert den PKA-Signalweg in DRG-Neuronen.** Der obere Bereich der Abbildung zeigt immunocytochemische Färbungen von DRG-Neuronen. In der linken Spalte ist jeweils ein exemplarisches Durchlichtbild eines DRG-Neurons für die entsprechende Behandlungsgruppe abgebildet. In der mittleren Spalte sind jeweils die entsprechenden Immunfärbungen gegen CREB, in der rechten Spalte die gegen PhosphoCREB zu sehen. Der Text in diesen Bildern beschreibt die verschiedenen Behandlungsgruppen. WT (Wildtyp) bedeutet Zellen, die vor der Färbung keiner speziellen Behandlung unterzogen wurden (n=37). Zeile 2 zeigt eine Zelle, die mit 1 μM NPY inkubiert wurde (n=102). Zeile 3 zeigt die Kontrolle für Zeile 2 nach zusätzlicher Inkubation mit dem PKA-Inhibitor H-89 (n=29). Die Inkubation mit Forskolin in Zeile 4 dient als Positivkontrolle der Aktivierung der PKA (n=57) und Zeile 5 zeigt den Effekt einer Aktivierung der AC (Forskolin) und einer gleichzeitigen Inhibierung der PKA (H-89) (n=22). Die in den Durchlichtbildern enthaltenen Maßstäbe entsprechen jeweils 10 μm. Die Balkendiagramme zeigen das jeweilige Verhältnis von PhosphoCREB zu CREB in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

In Abbildung 25 ist zu sehen, dass in unbehandelten Wildtyp DRG-Neuronen CREB hauptsächlich unphosphoryliert und nur zu etwa 2 % phosphoryliert vorliegt. Dieser Anteil kann durch Zugabe von NPY verdreifacht werden. NPY aktiviert also, der Hypothese entsprechend, den AC-Signalweg und führt über die Aktivierung der PKA zu einer Phosphorylierung von CREB. Durch Zugabe des PKA-Inhibitors H-89 kann der Effekt von NPY wieder aufgehoben und im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle sogar verringert werden, sodass so gut wie keine Phosphorylierung von CREB mehr stattfindet. Durch die Inkubation von DRG-Neuronen mit Forskolin wird der AC-Signalweg sehr stark aktiviert, sodass mehr als die Hälfte von CREB in phosphorylierter Form vorliegt. Inkubiert man die Neurone sowohl mit dem AC-Aktivator Forskolin als auch mit dem Inhibitor der PKA H-89, so beträgt der Anteil von phosphoryliertem CREB 100 %.

Die Abbildung zeigt zum einen, dass ein Großteil der Phosphorylierung von CREB in DRG-Neuronen über den AC-Signalweg durch Aktivierung von PKA läuft. Auch wurde gezeigt, dass in Wildtyp-Zellen so gut wie keine Phosphorylierung von CREB stattfindet und dass NPY das Verhältnis von PhosphoCREB/CREB um das 2,5-fache erhöht ( $P \leq 0,01$ ). Schließlich ist noch zu sagen, dass diese Methode zur Überprüfung der Aktivierung von Signalwegen an einem der Endpunkte der Signalkaskade ansetzt und somit nicht genau überprüft werden kann, welche anderen Schritte der Kaskade beeinflusst werden. Es kann also mit dieser Methode nicht untersucht werden, ob NPY durch die Aktivierung der AC und der PKA die Sekretion von LDCVs, wie oben beschrieben, beeinflusst. Es kann nur daraus geschlossen werden, dass prinzipiell eine Aktivierung der AC und der PKA durch NPY stattfindet.

Um genauere Informationen darüber zu erhalten, ob NPY seinen Effekt auf die LDCV-Sekretion über die Aktivierung der PKA vermittelt, wurden noch einmal Experimente mit TIRFM durchgeführt, in denen PKA durch die Zugabe von H-89 gehemmt wurde. Es wurde untersucht, ob die Sensibilisierung der Neurone hierdurch wieder aufgehoben werden kann.



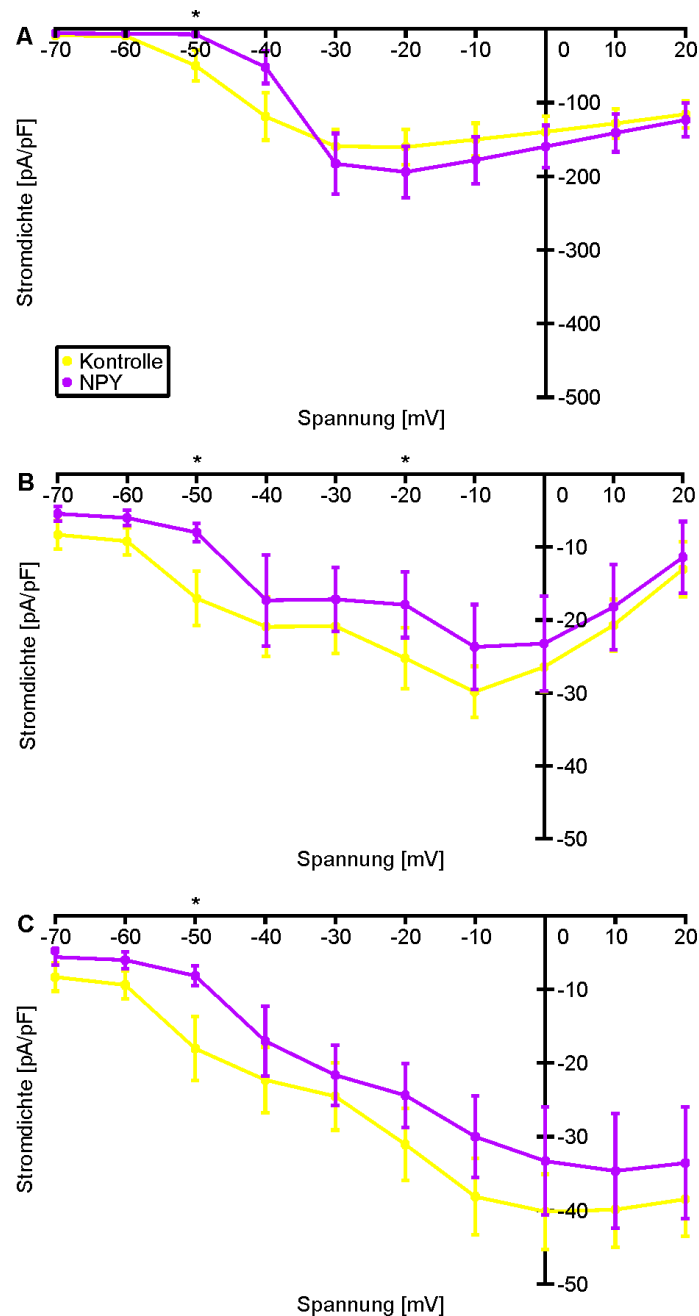
**Abbildung 26 : NPY vermittelt die Sensibilisierung von DRG-Neuronen für niederfrequente Stimulationen über die Aktivierung der PKA.** Aufgetragen ist die mittlere kumulative LDCV-Sekretion in Kontrollzellen ohne NPY-Applikation (Hellgrün: Film 1 Kontrolle; Gelb: Film 2 –NPY jeweils n=10) und in Zellen vor und nach NPY-Applikation (Türkis: Film 1 vor NPY; Lila: Film 2 +NPY jeweils n=12). Über den Graphen ist das Messprotokoll abgebildet. Es zeigt zunächst eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit dem PKA-Inhibitor H-89 und eine anschließende 3-minütige Stimulation der Neurone mit einem 5 Hz Prästimulus. Daran schließt sich der Beginn der TIRFM-Aufnahme unmittelbar an. Während dieser Aufnahme wird nach 1 Minute der niederfrequente Stimulus in einen hochfrequenten 100 Hz Stimulus geändert, welcher für 3 min bis zum Ende der TIRFM-Aufnahme appliziert wird. Dann folgt eine 5-minütige Inkubation mit NPY bzw. Kontrolllösung ohne NPY, während der anhaltend der 5 Hz Stimulus appliziert wird. Schließlich startet eine weitere 4-minütige TIRFM-Aufnahme, in der wieder nach 1 Minute vom niederfrequenten zum hochfrequenten Stimulus gewechselt wird. In den Graphen ist des Weiteren die Steigung der verschiedenen Abschnitte der Kurven ( $\tau$ ) dargestellt und die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Vergleicht man die Werte der Kontrollzellen vor und nach Inkubation in Extrazellulärlösung miteinander, so zeigt sich, dass die Sekretionsrate kaum verändert wird. Aus Abbildung 26 ist abzulesen, dass die Sekretionsrate in den Kontrollzellen, sowohl vor als auch nach Inkubation in der niederfrequenten 5 Hz, aber auch in der hochfrequenten 100 Hz Stimulation, sehr gering ist. In Zellen vor bzw. nach NPY-Zugabe ist die Rate bei der 5 Hz Stimulation sowohl vor als auch nach NPY-Zugabe im Vergleich zur 100 Hz Stimulation hoch. Im Gegensatz zu den in Abbildung 20 gezeigten Werten zeigt sich, dass in den mit NPY inkubierten Zellen die Sekretion vor und nach NPY-Zugabe nicht konstant bleibt, sondern dass jeweils beim Wechsel zur 100 Hz Stimulation die Rate abfällt. Beträgt die Sekretionsrate in Film 1 vor NPY-Applikation noch 0,013 LDCVs/s, sinkt sie beim Wechsel zum 100 Hz Stimulus auf 0,003 LDCVs/s. Die Verläufe der beiden Graphen vor und nach Inkubation mit NPY sind also sehr ähnlich und weisen keine erkennbaren Unterschiede auf. Nach NPY-Applikation ist die Sekretionsrate bei 5 Hz auf 0,010 LDCVs/s gestiegen, aber auch hier sinkt sie bei der 100 Hz Stimulation wieder auf 0,004 LDCVs/s. Auch die mittlere Anzahl der sezernierten Vesikel ist mit 1,5 Vesikeln vor NPY-Inkubation im Vergleich zu 1,7 Vesikeln nach NPY-Applikation nahezu unverändert. Bei den Kontrollzellen ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Vor

Inkubation beträgt die Rate bei 5 Hz 0,003 LDCVs/s und bei 100 Hz 0,001 LDCVs/s. Nach Inkubation mit Kontrolllösung beträgt die Sekretionsrate sowohl beim nieder- als auch beim hochfrequenten Stimulus 0,004 LDCVs/s. Auch hier ist in den Verläufen der Graphen vor und nach Inkubation in Kontrolllösung kein Unterschied zu erkennen. Allerdings ist hier zu sehen, dass die mittlere Anzahl sezernierter Vesikel vor Inkubation mit Kontrolllösung von 0,3 Vesikeln/Zelle auf 1 Vesikel/Zelle nach Inkubation steigt. Vergleicht man die Raten der beiden Graphen nach Inkubation mit Kontrolllösung bzw. NPY miteinander, sind diese einander sehr ähnlich. Generell sollte noch erwähnt werden, dass in dieser Versuchsreihe verhältnismäßig wenige Zellen überhaupt sezerniert haben (28 % antwortende Zellen bei Inkubation in Kontrolllösung; 38 % antwortende Zellen bei NPY-Inkubation) und auch die Anzahl sezernierter Vesikel sehr gering war. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass NPY seinen sensibilisierenden Effekt auf die LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen über die Aktivierung der AC und der PKA ausübt. Inkubiert man Zellen mit 0,05  $\mu$ M NPY, führt dies zu einer gesteigerten Sekretion von LDCVs sowohl bei hoch- als auch bei niederfrequenter Stimulation, welche normalerweise kaum die Exozytose von LDCVs induziert (Abbildung 20). Blockiert man nun zunächst PKA durch die Zugabe ihres Antagonisten H-89 und inkubiert dann DRG-Neurone mit NPY, so verschwindet der gerade beschriebene sensibilisierende Effekt von NPY (Abbildung 26). Welche Zielproteine die PKA nach Aktivierung durch die Bindung von NPY an einen seiner Rezeptoren phosphoryliert, um den beschriebenen sensibilisierenden Effekt hervorzurufen, konnte in diesen Experimenten nicht abschließend geklärt werden.

Wie oben bereits beschrieben, beeinflusst NPY über AC und die PKA die Aktivität von L-Typ VDCCs in Neuronen des submandibularen Ganglions. Da eine Aktivierung der PKA durch NPY auch in eigenen Experimenten in DRG-Neuronen nachgewiesen wurde, wurden zur Klärung der noch offenen Frage nach den Zielproteinen der PKA in DRG-Neuronen elektrophysiologische Patch-Clamp-Experimente durchgeführt. Diese Experimente sollten zeigen, ob spannungsabhängige Kanäle, welche potenzielle Zielproteine der PKA darstellen, durch NPY beeinflusst werden.



**Abbildung 27: NPY führt zu einer verspäteten Aktivierung spannungsabhängiger Natrium- und Calciumkanäle in DRG-Neuronen.** Dargestellt sind Strom-Spannungsdichte-Kurven, erstellt aus elektrophysiologischen Patch-Clamp-Experimenten an DRG-Neuronen. Gemessen wurde im Whole-Cell-Modus in der Spannungs-klemme. Die Neurone wurden vom Ruhemembranpotential (-70 mV) in 10 mV Einheiten schrittweise depolarisiert und der daraus resultierende Strom gemessen. Getestet wurden Kontrollzellen (Gelb: Kontrolle n=12) ohne jegliche Applikation und Zellen, die 5 min mit 0,05  $\mu$ M NPY inkubiert wurden (Lila: NPY n=9). Untersucht wurden die Stromdichte von (A) Natrium, (B) Calcium und (C) des „Tail-current“ in Abhängigkeit von der angelegten Spannung. Die Fehlerbalken zeigen den SEM, \* zeigen Signifikanzen mit  $P \leq 0,05$ .

Abbildung 27 zeigt Strom-Spannung-Kurven von DRG-Neuronen nach Inkubation mit Kontrolllösung bzw. nach Inkubation mit 0,05  $\mu$ M NPY. Da bei den Messungen keine Pharmaka zur selektiven Inhibition einzelner Komponenten zugegeben wurden, kann es sich

bei den gezeigten Strömen durchaus um Mischströme handeln. So ist es möglich, dass in den Calciumstrom und in den Tail-current noch Kaliumströme mit einfließen, obwohl in der intrazellulären Pipettenlösung kein Kalium enthalten war. Dennoch kann das noch in der Zelle selbst vorhandene Kalium das Aussehen der Kurven beeinflusst haben.

Mithilfe der Software Pulse wurden 3 Arten von Stromdichten isoliert: Natrium, Calcium und der Tail-current (Abbildung 27). Die Strom-Spannungsdichte-Kurven zeigen die Stromdichte bei der jeweils angelegten Spannung, sodass die Größen der Zellen ebenfalls bei den Ergebnissen berücksichtigt werden. Für die Stromdichte des Natriumstroms (Abbildung 27 A) zeigt sich, dass in den Kontrollzellen der maximale Einstrom von  $160 \text{ pA/pF} \pm 23,0 \text{ pA/pF}$  bei einer angelegten Spannung von  $-30 \text{ mV}$  beobachtet wird. Bei den mit NPY inkubierten Zellen ist der Einstrom mit  $194 \text{ pA/pF} \pm 35,1 \text{ pA/pF}$  bei einer Spannung von  $-20 \text{ mV}$  maximal. Die Kurve wird insgesamt zu positiveren Spannungen verschoben und nach NPY-Inkubation ist die maximale Stromdichte für Natrium generell größer. Einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kurven gab es nur bei einer angelegten Spannung von  $-50 \text{ mV}$  ( $P=0,019$ , Mann-Whitney U-Test). Hier findet nach NPY-Zugabe kaum Einstrom von Natrium statt ( $7,4 \text{ pA/pF} \pm 1,2 \text{ pA/pF}$ ), in den Kontrollzellen hingegen gibt es bereits einen Einstrom von  $49,8 \text{ pA/pF} \pm 21,0 \text{ pA/pF}$ . Insgesamt kann man zum Verlauf der Kurven sagen, dass bei den niedrigen Spannungen der Einstrom sehr abrupt passiert und nicht langsam zunimmt, was dafür spricht, dass es bei den Messungen ein Space-Clamp-Problem gab und die Zellen aufgrund ihrer Größe nicht genau auf die angegebene Spannung geklemmt waren. Der Verlauf der Calciumstromdichte (Abbildung 27 B) sieht in beiden Behandlungsgruppen sehr ähnlich aus. Generell ist die Stromdichte in den NPY behandelten Zellen etwas geringer als in den Kontrollzellen. Für Kontrollzellen liegt die maximale Stromdichte bei  $29,9 \text{ pA/pF} \pm 3,5 \text{ pA/pF}$  bei  $-10 \text{ mV}$  angelegter Spannung, für Zellen nach NPY-Inkubation bei  $23,7 \text{ pA/pF} \pm 5,8 \text{ pA/pF}$ . Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollzellen und mit NPY inkubierten Zellen können bei  $-50 \text{ mV}$  ( $P=0,02$ , t-Test) und bei  $-20 \text{ mV}$  ( $P=0,03$ , t-Test) festgestellt werden. Insgesamt verlaufen beide Kurven nicht wie erwartet. Bei schrittweise steigender Depolarisation sollten prinzipiell mit jedem Schritt mehr Kanäle bis zu einem Maximalwert aktiviert werden, was sich in einer Steigerung der Stromdichte bis zu einem Maximalwert äußern würde. Die Kurven zeigen jedoch bei  $-40 \text{ mV}$  und  $-20 \text{ mV}$  eine Abnahme der Stromdichte statt zum Maximum hinlaufende steigende Werte. Dies spricht dafür, dass die Ströme bei der Analyse nicht richtig isoliert und die Zellen, wie bereits bei der Analyse



der Natriumstromdichte, während der Messung möglicherweise nicht richtig geklemmt werden konnten (Space-Clamp-Problematik). Bei der Stromdichte des Tail-current ist zu beobachten, dass auch diese nach NPY-Inkubation insgesamt geringer ist als bei Inkubation mit Kontrolllösung. Die Kurve nach NPY-Inkubation ist hier im Ganzen nach rechts, also zu positiveren Potentialen hin, verschoben. Das Maximum in den Kontrollzellen liegt für eine Spannung von 0 mV bei  $40,2 \text{ pA/pF} \pm 5,1 \text{ pA/pF}$ . In NPY inkubierten Zellen ist das Maximum bei einer Spannung von +10 mV  $34,7 \text{ pA/pF} \pm 7,8 \text{ pA/pF}$ . Auch hier ist wieder ein signifikanter Unterschied bei -50 mV zu beobachten ( $P=0,02$ ).

All diese Werte deuten darauf hin, dass nicht die Ströme direkt durch NPY beeinflusst werden, sondern dass evtl. das Ruhemembranpotential der Zellen durch NPY verschoben wird. Es wurde versucht, dies in weiteren elektrophysiologischen Current-Clamp-Experimenten zu bestätigen, allerdings war ein Auswerten dieser Messungen kaum möglich. Es zeigte sich, dass über die Dauer dieser Messungen alle Zellen, ob mit oder ohne Zugabe von NPY, ihr Ruhemembranpotential so stark änderten, dass ein möglicher Effekt nicht erkennbar gewesen wäre.

Abschließend kann zu diesem Teil der Arbeit gesagt werden, dass mithilfe von Immunocytochemie gezeigt werden konnte, dass durch die Bindung von NPY an bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche von DRG-Neuronen mitunter die Adenylatcyclase aktiviert wird, welche ATP in cAMP umwandelt. Dadurch wiederum wird die Proteinkinase A aktiviert und kann schließlich Zielproteine, wie beispielsweise Calciumkanäle, in der Zelle phosphorylieren. Des Weiteren zeigten Experimente mit TIRFM, dass der durch NPY vermittelte Effekt der Sensibilisierung der Neurone hinsichtlich der LDCV-Sekretion durch die Aktivierung der PKA geschieht, da dieser Effekt nach Blockierung der PKA nicht mehr zu beobachten ist. Schließlich wurde in elektrophysiologischen Experimenten gezeigt, dass NPY einen Einfluss auf die Aktivierung des Natrium- und des Calciumstroms hat, welche durch NPY, im Vergleich zu Kontrollzellen, bei um 10 mV höheren Spannungen aktiviert werden. Dies zeigte sich in einer Rechtsverschiebung der Strom-Spannungs-Kurven. Da Kanäle also später aktiviert werden, spricht diese Verschiebung für eine mögliche Änderung des Ruhemembranpotentials.

## 4. Diskussion

Obwohl LDCVs wichtige Informationsträger in Neuronen darstellen, wurde ihre Freisetzung in diesem Zelltyp bisher kaum erforscht. Die meisten Erkenntnisse über Exozytose von Vesikeln wurden bisher bei der Freisetzung von SVs aus Neuronen oder von LDCVs aus neuroendokrinen Zellen, wie beispielsweise Chromaffinzellen der Nebenniere, gewonnen. Da LDCVs in Neuronen aber bezüglich ihrer Funktion kaum mit den gerade genannten Vesikeln vergleichbar sind, ist das Wissen um die Regulation und den Mechanismus ihrer Freisetzung aus Neuronen von großer Bedeutung.

### 4.1. Die Freisetzung von LDCVs in DRG-Neuronen geschieht hauptsächlich bei hochfrequenter Stimulation

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DRG-Neurone zur effizienten Exozytose von LDCVs am Soma einen starken Stimulus von 100  $\mu$ A und eine Pulslänge von 3 ms bei einer hohen Frequenz von 100 Hz benötigen. Des Weiteren führt das Voranstellen eines Prästimulus von 5 Hz, welcher selbst kaum LDCV-Sekretion auslöst, dazu, dass über die gesamte Dauer einer hochfrequenten Stimulation konstant LDCVs freigesetzt werden können.

Dieser Befund steht in Einklang mit anderen bisher gemachten wissenschaftlichen Untersuchungen an DRG-Neuronen. In gesunden peptidergen Neuronen wurde eine spontane Aktivität von 0,5-5 Hz gefunden (Wall und Devor, 1983). Diese Grundaktivität dient vermutlich dazu, Neuronen Informationen über ihren eigenen oder auch möglicherweise den Zustand ihrer Umgebung zu übermitteln. Die Grundaktivität vermittelt, dass keine Schädigung von Nerven vorliegt. Trotzdem bleiben die Neurone für eine mögliche starke Stimulation sensibilisiert, indem bei einer basalen Rate an Aktionspotentialen Vesikel zum Ort der Exozytose transportiert und dort in einen fusionskompetenten Zustand gebracht werden. Zudem ist die Expression von Neuromodulatoren, wie beispielsweise NPY, in gesunden DRG-Neuronen sehr gering (Schoenen et al., 1989; Zhang et al., 1995a). Bei einer Verletzung von Nerven ändert sich das Verhalten der DRG-Neurone dramatisch. So wird zum einen die Expression vieler Neuromodulatoren, wie z.B. NPY, stark hochreguliert (Schoenen et al., 1989). Zum anderen wurde beobachtet, dass die Frequenz der Aktionspotentiale auf

bis zu 50 Hz ansteigt (Michaelis et al., 2000; Wall und Devor, 1983). Ebenfalls wurde beschrieben, dass unter basalen Bedingungen ein schneller, hauptsächlich retrograder Transport der LDCVs in Axonen stattfindet, der durch Stimulation verlangsamt wird. Da gleichzeitig LDCVs häufiger an einer Position verharren (Sobota et al., 2010), wodurch die Wahrscheinlichkeit ihrer Freisetzung erhöht wird, liegt die Vermutung nahe, dass *in vivo* unter basalen Bedingungen kaum LDCV-Sekretion stattfindet. Werden hingegen Nervenfasern verletzt, erhöht sich die Frequenz der Stimulation bzw. die Generierung von Aktionspotentialen und DRG-Neurone schütten zur Modulation schmerzhafter Empfindungen vermehrt den Inhalt ihrer LDCVs aus. Die gerade beschriebene Hypothese wird durch die in dieser Arbeit gefundenen Bedingungen zur Induktion der LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen gestützt.

Weiter wurde gezeigt, dass ein niederfrequenter Prästimulus nur zu einem geringen Einstrom von Calcium in die Zellen führt (Abbildung 9), hingegen der Wechsel zu einer hochfrequenten Stimulation eine starke Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  auslöst. Dies gibt einen Hinweis drauf, dass ein geringer Einstrom von Calcium keine LDCV-Exozytose auszulöst. Vielmehr dient dieser eher dazu, LDCVs vor Fusion in einen gedockten oder gepimten Zustand zu versetzen und sie somit fusionskompetent zu machen. Leider kann für die durchgeführten Messungen keine exakte, quantitative Aussage über die globale Calciumkonzentration in den Zellen bei verschiedenen Stimulationen gemacht werden, da diese Messungen an einem Messstand stattfanden, der nicht auf den benutzten Calciumindikator Fura-2 geeicht war. Zudem kann die Messung der globalen Calciumkonzentration nur einen Hinweis auf die Konzentration an der Plasmamembran, sprich dem Ort der Exozytose, geben (Klingauf und Neher, 1997); genau bestimmt werden kann sie jedoch mit der hier genutzten Methode nicht. Es kann allerdings vermutet werden, dass die  $[Ca^{2+}]_i$  an der Plasmamembran während der Stimulation in etwa bei dem von Huang und Neher (1996) beschriebenen Wert zur Einleitung der Exozytose von LDCVs von mehr als 600 nM liegt. Interessanterweise wurde beobachtet, dass unterschiedliche Stimulationen in etwa die gleichen Maximalwerte für die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  lieferten. Hier besteht die Möglichkeit, dass Fura-2 ( $K_d$  für Calcium: 224 nM) durch einen über diese Konzentration hinausgehenden Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  gesättigt wurde und somit mögliche Unterschiede nicht mehr sichtbar waren. Die nur leichte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  und eine kaum stattfindende LDCV-Sekretion bei einer niederfrequenten Stimulation sprechen dafür, dass eine geringe Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$

während basaler Aktivität der DRG-Neurone nicht zur Induktion von Exozytose dient, sondern vielmehr LDCVs in einen fusionskompetenten Zustand versetzt. Mögliche calciumsensitive Schritte bei der Exozytose sind die Reifungsstadien Docking und Priming. Die Calciumabhängigkeit von Docking wurde beispielsweise in Chromaffinzellen der Nebenniere gezeigt (Pasche et al., 2012). Auch in Neuronen des trigeminalen Ganglions, die in ihrer Art und Funktion DRG-Neuronen sehr ähnlich sind, gibt es einen Mechanismus, der durch einen Calciumeinstrom bei Stimulation zu einem verlangsamten Transport von LDCVs und deren längerer Verweildauer an einer Stelle führt (Sobota et al., 2010). Dieser Effekt ist vermutlich ebenfalls auf eine erhöhte Dockingrate zurückzuführen. Für das Priming wurde sie sowohl bei LDCVs in Chromaffinzellen als auch bei SVs in Neuronen nachgewiesen (Neher und Zucker, 1993; Neher und Sakaba, 2008; Voets, 2000). Ein Einfluss auf das Docking von LDCVs in DRG-Neuronen würde sich in einer verlängerten Verweildauer der Vesikel an der Plasmamembran zeigen. Untersucht man diese in DRG-Neuronen, so zeigt sich, dass sie durch eine geringe Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , wie sie von einem niederfrequenten Stimulus hervorgerufen wird, nicht verändert wird. Somit kann gesagt werden, dass das Docking von LDCVs in DRG-Neuronen durch die von einem niederfrequenten Prästimulus induzierte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  nicht beeinflusst wird (Abbildung 16 und Abbildung 17). Nach Addition eines niederfrequenten Prästimulus wird die durchschnittliche Menge sezernierter LDCVs, im Vergleich zu Zellen ohne vorhergehenden 5 Hz Stimulus, erhöht (Abbildung 10 C). Daraus lässt sich ein möglicher Einfluss der Calciumkonzentration auf das Priming ablesen. Die Latenzzeit zwischen Stimulation und Sekretion des ersten LDCVs ist in Zellen ohne Prästimulus mit  $42,2 \pm 7,1$  s sehr lang. Die Addition des niederfrequenten Prästimulus bzw. die dadurch ausgelöste leichte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  fördert Priming, wodurch die Latenzzeit auf  $28,3 \pm 5,9$  s verkürzt werden kann. Da ähnlich lange Latenzzeiten für die Sekretion von LDCVs bisher auch in anderen Neuronen gefunden wurden (Shinoda et al., 2011; Xia et al., 2009), scheint die Beziehung zwischen Stimulation und Sekretion von LDCVs in Neuronen generell schwach zu sein. Dies lässt darauf schließen, dass in Neuronen verschiedene Vesikelpools, wie für LDCVs in Chromaffinzellen oder SVs in Neuronen beschrieben (Becherer und Rettig, 2006; Sorensen, 2004), nicht existieren.

Vergleicht man die Menge sezernierter LDCVs aus DRG-Neuronen über einen Zeitraum von einigen Minuten mit der Menge der Freisetzung von SVs aus Neuronen oder LDCVs aus

Chromaffinzellen, so ist diese eher gering (Becherer et al., 2007; Hugo et al., 2013; Ikeda und Bekkers, 2009). Natürlich muss man berücksichtigen, dass durch die genutzte Technik der TIRFM zur Untersuchung der LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen nur ein Bruchteil der Zelle beobachtet wurde und somit keine Aussage über die Anzahl freigesetzter LDCVs in der gesamten Zelle gemacht werden kann. Auch kann man nicht ausschließen, dass bei einer Stimulation LDCVs freigesetzt werden, die nicht mit dem Fusionsprotein NPY-Venus beladen und somit in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, wie der TIRFM, unsichtbar sind. Dennoch ist auch unter Berücksichtigung dieser Aspekte die Rate der Sekretion von LDCVs vergleichsweise gering. Dies kann dadurch erklärt werden, dass LDCVs in Neuronen im Gegensatz zu SVs nicht an spezialisierten Stellen der Zelle freigesetzt werden, an denen eine hohe Dichte an VDCCs und somit bei Stimulation eine hohe Calciumkonzentration herrscht. Auch wenn es in DRG-Neuronen eine calciumunabhängige Sekretion von LDCVs zu geben scheint, wird dennoch der Großteil der LDCVs durch calciumabhängige Exozytose freigesetzt (Huang und Neher, 1996; Zhang und Zhou, 2002). Auch in Chromaffinzellen ist die Wahrscheinlichkeit, dass LDCVs in der Nähe von Calciumkanälen liegen und somit durch einen Calciumeinstrom bei Stimulation nach und nach aus den verschiedenen Vesikelpools freigesetzt werden können (Becherer und Rettig, 2006), aufgrund der geringen Größe dieser Zellen ( $\emptyset$  des Somas: ca. 10  $\mu\text{m}$ ) und der hohen Dichte an LDCVs, wesentlich größer als für LDCVs in Neuronen ( $\emptyset$  des Somas von DRG-Neuronen je nach Klasse: 12-55  $\mu\text{m}$ ). Zusammenfassend könnte also eine Begründung für die geringe Rate der LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen sein, dass nur LDCVs freigesetzt werden, die sich bei Stimulation in einer Umgebung hoher Calciumkonzentration, sprich in unmittelbarer Nähe von VDCCs, und in einem geprimten Zustand befinden. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Zustand von LDCVs ist im Vergleich zu LDCVs in Chromaffinzellen oder SVs in Neuronen in DRG-Neuronen wesentlich geringer. Eine weitere Erklärung für die geringe Menge sezernierter Vesikel bezieht sich nicht auf die Exozytose selbst. Für Neuromodulatoren und deren Rezeptoren wurde in vielen Fällen ein sogenanntes „peptide/receptor mismatch“ (Peptid/Rezeptor Versatz) gefunden (Merighi et al., 2011). Dies bedeutet, dass Neuromodulatoren über größere Distanz wirken als Neurotransmitter im synaptischen Spalt, da sich ihre Rezeptoren meist in einiger Entfernung zum Ort der Freisetzung befinden. Neuromodulatoren besitzen eine 1000-fach höhere Bindungsaffinität zu ihren Rezeptoren als Neurotransmitter zu deren Rezeptoren (Merighi et al., 2011), was erklärt, dass trotz der verhältnismäßig großen Distanz

zwischen Ligand und Rezeptor nicht zwingend große Mengen Neuromodulator aus LDCVs freigesetzt werden müssen, um einen auto- oder parakrinen Effekt erzeugen zu können.

Nicht nur eine elektrische Feldelektrodenstimulation, sondern auch die Applikation einer 60 mM Kaliumlösung führt sowohl zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  als auch zu einer Induktion von LDCV-Sekretion in DRG-Neuronen. Der Vorteil dieser Stimulationsart liegt darin, dass man mithilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnen kann, zu welchem Grad eine Zelle depolarisiert wird. Für 60 mM Kalium erfolgt eine Depolarisation auf ca. 0 mV und somit sicher über den Schwellenwert zum Auslösen von Aktionspotentialen. Bei einer elektrischen Stimulation mittels Feldelektrode lässt sich der Grad der Depolarisation im Vorhinein nicht abschätzen, weshalb in dieser Arbeit auch zunächst verschiedene Stimuli getestet werden mussten. Allerdings bietet eine Feldelektrodenstimulation im Gegensatz zur Applikation einer depolarisierenden Lösung die Möglichkeit einer zeitlich und räumlich präzisen Stimulation. Durch den Einsatz spannungsabhängiger Indikatoren oder elektrophysiologischer Messungen mithilfe der Patch-Clamp-Technik wäre es möglich, den Grad der Depolarisation zu bestimmen. Bisher wurde gezeigt, dass für eine robuste Freisetzung von LDCVs am Soma von DRG-Neuronen, ob calciumab- oder -unabhängig, eine Depolarisation auf  $\geq -10$  mV erfolgen muss (Huang und Neher, 1996; Zhang und Zhou, 2002). Aus dieser Information wird geschlossen, dass ein ähnlicher Grad der Depolarisation in der selbst durchgeführten Studie auch mit den getesteten Feldelektrodenstimulationen in DRG-Neuronen, bei denen LDCV-Sekretion stattfand, erreicht wurde.

Ob es sich bei den beobachteten Sekretionsereignissen um calciumabhängige oder -unabhängige Exozytose handelt, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden (siehe Abschnitt 4.3.).

Generell konnte in dieser Arbeit zunächst gezeigt werden, dass durch eine Stimulation, die einer basalen Frequenz an Aktionspotentialen entspricht, die intrazelluläre Calciumkonzentration leicht erhöht wird, wodurch Priming gefördert wird. Zur Induktion von LDCV-Sekretion hingegen sind eine hochfrequente Stimulation und eine hohe intrazelluläre Calciumkonzentration nötig, wie sie *in vivo* nach Verletzungen von Nerven auftritt. Auch wurde beobachtet, dass im Vergleich zur Sekretion von LDCVs in neuroendokrinen Chromaffinzellen und SVs in Neuronen sehr wenige LDCVs aus DRG-Neuronen freigesetzt

werden. Dies ist vermutlich auf ihre Funktion als „lediglich“ sekundäre Informationsträger und eine hohe Affinität der Neuromodulatoren zu ihren Rezeptoren zurückzuführen.

#### **4.2. DRG-Neurone besitzen verschiedene Typen der Exozytose von LDCVs**

Durch die Verwendung verschiedener Fusionstypen besitzen Neurone neben der Anzahl sezernierter Vesikel eine weitere Möglichkeit, um die Menge freigesetzter Botenstoffe und somit die Reizweiterleitung oder die Neuromodulation zu regulieren. Bei der Durchsicht der Exozytoseereignisse in DRG-Neuronen zeigte sich, dass auch LDCVs aus DRG-Neuronen nicht nach nur einem Schema freigesetzt werden. Es wurden 3 verschiedene Modi der Exozytose beobachtet: „Full Fusion“, „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“. Da LDCVs nicht wie SVs lokal am Ort der Exozytose wieder recycelt werden können (Hokfelt et al., 1980; Merighi et al., 2011), sondern wegen der Synthese ihres Inhaltes, die den Zellkern, das endoplasmatische Retikulum und das Golgi-Netzwerk benötigt, immer wieder im Soma neu hergestellt und befüllt werden müssen, bieten verschiedene Fusionstypen Neuronen die Möglichkeit, LDCVs mehrfach zu nutzen. Des Weiteren werden Neuromodulatoren ohnehin, aufgrund der hohen Affinität zu ihren Rezeptoren, nur in geringen Konzentrationen benötigt, um einen Effekt zu vermitteln. Deshalb ist es nicht erforderlich, LDCVs immer vollständig durch „Full Fusion“-Exozytose zu entleeren. Das Auftreten verschiedener Modi der Exozytose macht somit die Freisetzung von Neuromodulatoren effizienter.

In DRG-Neuronen zeigten sich die verschiedenen Fusionstypen durch unterschiedliche Kinetiken bei der Freisetzung des pH-sensitiven Fluoreszenzproteins Venus, gekoppelt an NPY. Ähnliche Kinetiken bzw. Fusionstypen wurden beispielsweise auch in kortikalen Neuronen beschrieben. Aufgrund der Nutzung eines anderen pH-sensitiven Fluoreszenzproteins, das vor Fusion nicht sichtbar ist, konnten von de Wit et al. (2009) nur 2 Typen der Sekretion beobachtet werden: transiente und andauernde Fusion. Auch Xia et al. (2009) beschreiben verschiedene Modi der Exozytose. Generell sollte bei einem Vergleich von Fusionstypen darauf geachtet werden, dass Ereignisse in verschiedenen Neuronen zwar gleichen Modi zugeordnet werden, ihre Kinetiken jedoch sehr unterschiedlich aussehen können. Zum einen kann das daran liegen, dass unterschiedliche Fluoreszenzproteine genutzt wurden, die festlegen, ob ein Vesikel vor Exozytose bereits sichtbar ist. Zum anderen kann auch die Aufnahmefrequenz bei der Untersuchung der Ereignisse eine große Rolle

spielen. In dieser Arbeit wurde für DRG-Neurone gezeigt, dass viele Ereignisse innerhalb einiger 100 ms stattfinden. Nutzt man hingegen eine Aufnahmefrequenz von 1 Hz, wie dies in kortikalen Neuronen getan wurde, kann man diese Ereignisse nicht detailliert auflösen. Es scheint, dass Fusionsereignisse von LDCVs in kortikalen Neuronen generell länger dauern als in DRG-Neuronen, was eine langsamere Aufnahmefrequenz rechtfertigt. Der unterschiedlichen Geschwindigkeit von Fusionsereignissen und dementsprechend der unterschiedlichen Menge an freigesetzten Substanzen in kortikalen Neuronen und DRG-Neuronen könnte eine grundsätzlich andere Verteilung der Rezeptoren der Neuromodulatoren in Gehirn und DRGs, sprich unterschiedliche Distanzen zwischen dem Ort der Freisetzung und den Rezeptoren der Neuromodulatoren, zugrunde liegen. Je weiter die Entfernung zwischen dem Ort der Exozytose und den Rezeptoren der neuromodulatorischen Substanzen ist, desto mehr Substanz müsste freigesetzt werden, um deren stärkere Verdünnung auf dem Weg im extrazellulären Raum zu kompensieren und eine Aktivierung der Rezeptoren zu gewährleisten. Ein weiterer Aspekt, der beim Vergleich von Fusionstypen von LDCVs in verschiedenen Neuronen und bei unterschiedlichen Messbedingungen berücksichtigt werden muss, ist die scheinbare Abhängigkeit des Verlaufes eines Fusionsereignisses vom Inhalt der LDCVs. So können kleine Peptide, wie beispielsweise NPY, schneller durch eine kleine Fusionspore entweichen als große Proteine wie BDNF, die eine wesentlich größere Öffnung der Fusionspore und eine längere Öffnungsdauer dieser benötigen (de Wit et al., 2009).

In DRG-Neuronen wurde untersucht, wie häufig die drei identifizierten Fusionstypen vorkommen. Hier zeigte sich bei einer Feldelektrodenstimulation, die einer physiologischen Stimulation nach einer Nervenschädigung nahekommt (s. o.), eine klare Präferenz für den „Full Fusion“-Modus. „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ hingegen werden eher selten genutzt. Dies zeigt, dass bei Verletzungen, bei denen eine schmerzhaft Wahrnehmung oft mit einhergeht, nicht nur insgesamt viele LDCVs sezerniert werden, sondern dass deren Inhalt zudem meist vollständig freigesetzt wird, um einen entsprechenden neuromodulatorischen Effekt zu erzielen und die Aktivität von DRG-Neuronen zu modulieren (Fjell et al., 1999; Leffler et al., 2002; Ryu et al., 1988). Appliziert man hingegen eine Lösung mit 60 mM Kalium, so zeigen DRG-Neurone keinen bevorzugten Modus der Exozytose. Alle Fusionstypen kommen mit gleicher Häufigkeit vor, was im Umkehrschluss bedeutet, dass weniger neuromodulatorische Substanzen freigesetzt werden und dass diese Art der



Stimulation physiologischen *in vivo* Bedingungen weniger ähnlich ist als eine Feldelektrodenstimulation. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen an hippocampalen Neuronen, die bei der gleichen Stimulationsart ebenfalls kaum „Full Fusion“-Ereignisse, jedoch eine klare Präferenz für den „Kiss and Run“-Modus zeigen (Xia et al., 2009). Bei einer Feldelektrodenstimulation hingegen tritt auch in Dendriten hippocampaler Neurone vorzugsweise „Full Fusion“-Exozytose auf (Matsuda et al., 2009).

Betrachtet man die in DRG gefundenen Kinetiken der einzelnen Fusionsereignisse der LDCVs näher, kann man in jedem Fusionstyp verschiedene Schritte der Exozytose untersuchen. Die Dauer der Anstiegszeit der Fluoreszenz in „Full Fusion“ beispielsweise entspricht der Dockingzeit der LDCVs. Für „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ entspricht sie der Zeit bis zur maximalen Öffnung der Fusionspore und der Deprotonierung des LDCV-Lumens. Die Breite der Spitzenamplitude ist für „Full Fusion“ die Dauer, die Vesikel bis zu ihrer Verschmelzung mit der Plasmamembran in einem gedockten Zustand verbringen, für „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ entspricht sie dem Zeitraum, in dem die Fusionspore geöffnet ist. Die Abfallszeit der Fluoreszenz schließlich ist bei „Full Fusion“ die Zeit, die ein Vesikel zur Freisetzung seines gesamten Inhaltes benötigt. Bei „Kiss and Run“ umfasst sie das Schließen der Fusionspore, die Reazidifizierung des LDCV-Lumens und das Undocking des LDCVs von der Plasmamembran. Für „Kiss and Stay“ zeigt sie nur die Dauer, die zum Schließen der Fusionspore und der Reazidifizierung des LDCV-Lumens benötigt wird. Es ist also nicht überraschend, dass die jeweiligen Zeiten zwischen den verschiedenen Fusionstypen sehr unterschiedlich sind, da sie verschiedene Stadien der Exozytose repräsentieren. Dadurch lässt sich erklären, dass die Anstiegszeit der Fluoreszenz bei „Full Fusion“ im Vergleich zu „Kiss and Run“ oder „Kiss and Stay“ um ein Vielfaches höher ist, da „Full Fusion“-Ereignisse vor der eigentlichen Fusion zunächst das Reifungsstadium des Dockings durchlaufen. Bei „Kiss and Run“- und „Kiss and Stay“- Ereignissen sind die Vesikel hingegen nahe an der Plasmamembran und haben das Docking bereits vollzogen. Somit könnte man vermuten, dass „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ eher für eine schnelle, kurzzeitige Informationsweiterleitung dienen, „Full Fusion“-Ereignisse hingegen einen langsameren, aber durch die größere Menge freigesetzter Neuromodulatoren, stärkeren und dauerhafteren Effekt der Neuromodulation besitzen. Interessant ist, dass die Abfallszeit der Fluoreszenz in allen Fusionstypen sehr schnell und ähnlich ist. Dies liefert eine Erklärung dafür, warum man, im Gegensatz zu „Kiss and Run“- und „Kiss and Stay“-, bei „Full Fusion“-

Ereignissen selten das Ausbreiten einer fluoreszenten Wolke, also die Ausschüttung des Inhaltes des LDCVs, beobachten kann. Da die Abfallszeit der Fluoreszenz bei „Full Fusion“ so kurz ist, ist es möglich, dass der Inhalt des Vesikels zu schnell und weiträumig ausgeschüttet und im Extrazellulärraum in so kurzer Zeit verdünnt wird, dass dies selbst bei einer Aufnahmefrequenz von 10 Hz nicht detektierbar ist. Die Abfallszeit der Fluoreszenz für „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ sehr ähnlich ist. Diese Zeit umfasst aber im Fall von „Kiss and Run“ neben dem Schließen der Fusionspore und der Reazidifizierung des Vesikel-Lumens zusätzlich noch das Undocking des Vesikels von der Plasmamembran. Die ähnlichen Werte der beiden Fusionstypen deutet darauf hin, dass LDCVs, die „Kiss and Run“-Exozytose durchlaufen, eine hohe räumliche Flexibilität besitzen, die es ihnen durch schnellere Kinetiken als denen von „Kiss and Stay“-Ereignissen ermöglicht, nach Fusion an einer Stelle schnellstmöglich an einer anderen Stelle der Zelle für eine erneute Freisetzung zur Verfügung zu stehen. LDCVs, die „Kiss and Stay“-Exozytose durchlaufen, dienen hingegen, wie auch „Full Fusion“-Ereignisse, einer eher lokalen Neuromodulation und halten ihre Fusionspore daher etwas länger geöffnet als LDCVs bei „Kiss and Run“-Exozytose. Der Mechanismus, der dem Auftreten verschiedener Fusionstypen zugrunde liegt, ist schwierig aufzuklären. Für „Full Fusion“ ist man sich einig, dass es die Formierung eines stabilen SNARE-Komplexes benötigt, der die Fusion von der Vesikel- mit der Plasmamembran ermöglicht. Für „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ hingegen muss es einen regulatorischen Schritt geben, der die Form des Vesikels bei Fusion aufrechterhält und das vollständige Verschmelzen von Vesikel- und Plasmamembran verhindert. Ein möglicher Regulator ist eine calciumabhängige Beschichtung der Vesikel mit dem Strukturprotein Aktin (Miklavc et al., 2009), die bei der Exozytose der Vesikel und der Freisetzung deren Inhaltes eine Rolle spielt. Eine Möglichkeit, die Dynamik der Fusionspore zu regulieren, wurde für Myosin II gezeigt (Aoki et al., 2010). Nahe liegt auch eine Rolle des SNARE-Komplexes bei der Regulation der Fusionskinetik, allerdings würde es bedeuten, dass die Reaktion der Formierung eines *cis* SNARE-Komplexes reversibel sein müsste (Palfrey und Artalejo, 2003). Dennoch scheint das Auftreten bestimmter Fusionstypen mitunter abhängig von Calcium zu sein. In dieser Arbeit wurde in DRG-Neuronen gezeigt (Abbildung 9), dass trotz konstanter Stimulation die  $[Ca^{2+}]_i$  sinkt, was auf eine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Inaktivierung von VDCCs (Cens et al., 2006) zurückzuführen sein kann. Zur Untersuchung einer möglichen Verbindung zwischen dem Auftreten eines Fusionstyps und der  $[Ca^{2+}]_i$  wurde der Zeitpunkt des Auftretens der

einzelnen Fusionstypen während Stimulation näher untersucht. Es zeigte sich allerdings weder ein bevorzugter Zeitpunkt des Auftretens bestimmter Fusionstypen nach Beginn einer Stimulation noch eine Beeinflussung der Kinetik der Fusionstypen durch die Art der Stimulation (Abbildung 19). Einzig bei einer Stimulation bei 50 Hz mittels Feldelektrode kann man eine zeitliche Tendenz des Auftretens der verschiedenen Fusionstypen erkennen. So tritt „Full Fusion“ signifikant früher auf als „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“. Korreliert man den Zeitpunkt von „Full Fusion“ mit dem Calciumsignal in Abbildung 9, so könnte man daraus schließen, dass vor einer Abflachung des Calciumsignals, das heißt bei einer höheren  $[Ca^{2+}]_i$ , eher „Full Fusion“ auftritt und dass „Kiss and Run“ und „Kiss and Stay“ beide eine geringere Calciumkonzentration benötigen. Allerdings wurde diese Beobachtung nur für eine Stimulationsart gemacht und lässt daher keine allgemeine Schlussfolgerung über die Calciumabhängigkeit der verschiedenen Fusionstypen zu. Dennoch kann ein Einfluss von Calcium auf das Auftreten der verschiedenen Fusionstypen nicht ausgeschlossen werden, da man dies nur durch eine detaillierte Betrachtung der Calciumkonzentration direkt an der Plasmamembran bei Stimulation bzw. Fusion beurteilen könnte. Dies ist allerdings mit den hier genutzten Techniken aufgrund der zu geringen Auflösung nicht möglich.

Es konnte nachgewiesen werden, dass, wie bereits für die Sekretion von Vesikeln in anderen Zellen gezeigt, auch DRG-Neurone zur Freisetzung von LDCVs unterschiedliche Typen der Fusion nutzen, was ihnen eine Möglichkeit der Regulation der Ausschüttung von Neuromodulatoren bietet. Die Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Modi ist abhängig von der Art der Stimulation. Ob dies allerdings auf eine unterschiedliche Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  zurückzuführen ist, konnte nicht abschließend geklärt werden. Eine Veränderung der Kinetik einzelner Fusionsereignisse bei unterschiedlichen Stimulationsarten konnte nicht gezeigt werden. Eine Regulation der Menge freigesetzten Neuromodulators bei unterschiedlichen Stimulationen scheint in DRG-Neuronen also allein über die Menge freigesetzter LDCVs, nicht jedoch über eine Veränderung der Kinetik der einzelnen Fusionsereignisse zu erfolgen.

### 4.3. NPY erhöht die Rate der Sekretion von LDCVs aus DRG-Neuronen

Die Aufgabe des Inhaltes von LDCVs, beispielsweise NPY, in Neuronen ist die Modulation neuronaler Aktivität. NPY kommt eine wichtige Rolle in der Schmerzwahrnehmung zu, wobei bisher sowohl eine pro-nozizeptive als auch eine schmerzlindernde Wirkung beobachtet wurden (Intondi et al., 2008; Moran et al., 2004; Smith et al., 2007; Taiwo und Taylor, 2002). Die beschriebenen Effekte werden durch verschiedene Mechanismen in den Zellen vermittelt. Generell liegt diesen zunächst die Bindung von NPY an einen der fünf bisher identifizierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zugrunde (Tatemoto, 2004). Diese Bindung führt bei allen NPY-Rezeptoren im Folgenden zur Aktivierung des  $G\alpha_i$ -Signalweges (Brothers et al., 2010). Im zentralen Nervensystem und in DRG-Neuronen wurden bisher die Rezeptoren  $Y_1$  und  $Y_2$  gefunden, deren Aktivierung verschiedenste Zielproteine einer Zelle beeinflussen kann. Über die Häufigkeit des Vorkommens der beiden Rezeptoren in DRG-Neuronen gibt es widersprüchliche Angaben. So fanden Shi et al. (1998) nur auf 6 % der Neurone  $Y_1$ , auf 15 %  $Y_2$ . Wiley et al. (2009) hingegen beobachteten  $Y_1$  auf 20 % der Neurone und eine steigende Anzahl von  $Y_2$  nach einer Axotomie. In kultivierten DRG-Neuronen wurde sogar in 85 % der DRG-Neurone eine Expression von  $Y_1$  gefunden (Hiruma et al., 2002). Zu ihrer Lokalisation kann gesagt werden, dass  $Y_1$  sich hauptsächlich auf kleinen peptidergen C-Fasern befindet, wohingegen  $Y_2$  auch auf nicht-peptidergen Neuronen gefunden wurde (Brumovsky et al., 2005; Zhang et al., 1994). In DRG-Neuronen wurde gezeigt, dass durch die Bindung an  $Y_1$  eine verstärkte Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen erfolgt (Abdulla und Smith, 1999). Die Aktivierung von  $Y_2$  inhibiert die Freisetzung von Glutamat (Moran et al., 2004; Smith et al., 2007) und führt durch die Dämpfung der Aktivität von N-Typ Calciumkanälen und der calciumsensitiven Kaliumleitfähigkeit zu einer Verminderung der präsynaptischen Aktivität bei Stimulation (Abdulla und Smith, 1999; Bleakman et al., 1991; Toth et al., 1993; Walker et al., 1988; Wiley et al., 2009). Sowohl die Aktivierung von  $Y_1$  als auch von  $Y_2$  führen, durch die Inhibierung der Adenylatcyclase und der PKA, zu einem verminderten axonalen Transport (Hiruma et al., 2002). Da nach einer Nervenverletzung sowohl NPY als auch seine Rezeptoren in DRG-Neuronen stärker exprimiert werden (Schoenen et al., 1989; Wiley et al., 2009; Zhang et al., 1995a), ist neben der bereits beschriebenen Wirkung von NPY auf die synaptische Übertragung auch eine Regulation der LDCV-Freisetzung denkbar.

In dieser Arbeit zeigte sich zunächst, dass durch NPY in DRG-Neuronen eine insgesamt erhöhte Freisetzung von LDCVs stattfindet. Auch wurde beobachtet, dass die Neurone bereits bei niederfrequenter Stimulation, bei der sonst kaum LDCV-Sekretion stattfindet, vermehrt LDCVs sezernieren. Im Vergleich zu Kontrollzellen ohne NPY-Applikation war diese Erhöhung aufgrund der hohen Variabilität zwischen den Zellen allerdings nicht signifikant. Die Variabilität kann beispielsweise durch die unterschiedlichen Expressionslevel der NPY-Rezeptoren auf den einzelnen DRG-Neuronen erklärt werden. Die Beobachtung der vermehrten LDCV-Sekretion lässt sich mitunter durch den erhöhten Expressionslevel von NPY in DRG-Neuronen nach Verletzungen erklären. Denn eine effektive Neuromodulation nach Verletzungen kann nur dann stattfinden, wenn die Neurone die vermehrt produzierten neuromodulatorischen Substanzen auch vermehrt ausschütten. Den Effekt der vermehrten Neuromodulator-Ausschüttung zeigen DRG-Neurone nicht nur durch eine erhöhte Sekretion von LDCVs, sondern auch durch eine vermehrte, wenn erneut auch nicht signifikante, Nutzung der „Full Fusion“-Exozytose. Ein weiterer Effekt, der die vermehrte Neuromodulator-Ausschüttung zeigt, ist eine Verlängerung der Öffnungsdauer der Fusionspore bei „Kiss and Stay“-Ereignissen. Diese führt zwar durch das seltene Auftreten dieses Fusionstyps vermutlich nicht zu einer signifikant erhöhten Neuromodulator-Freisetzung, dennoch unterstützt sie diese. Alle Beobachtungen zeigen also, dass bei einer Verletzung von Nerven die Ausschüttung von NPY, welches stark hochreguliert wird, durch einen positiven Feedbackmechanismus auto- oder auch parakrin die Ausschüttung weiterer Neuromodulatoren, also die Exozytose von LDCVs, fördert.

Bei der Untersuchung des Mechanismus, durch den NPY seinen sensibilisierenden Effekt auf die LDCV-Freisetzung ausübt, zeigte sich zunächst, dass die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration bei Stimulation nicht offensichtlich durch NPY beeinflusst wird. In Abbildung 24 ist zwar unmittelbar nach NPY-Inkubation eine kleine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu erkennen, die aber, wenn auch geringer, in Kontrollzellen ebenfalls zu sehen ist. Dies lässt sich durch die mechanische Applikation von NPY- bzw. Kontrolllösung erklären, die zu einer Aktivierung dehnungssensitiver Natriumkanäle, somit zu einer leichten Depolarisation der Zellen und schließlich einem geringen Einstrom von Calcium in die Neurone führen kann.

In elektrophysiologischen Experimenten zeigte sich durch die Analyse verschiedener Ionenströme, dass NPY eine Verschiebung der Aktivierung von Ionenströmen um 10 mV bewirkt (Abbildung 27). Dies kann darauf hindeuten, dass NPY das Ruhemembranpotential

der Zellen verändert, wodurch stärkere Depolarisationen benötigt werden, um Aktionspotentiale auszulösen. Konsequenz dieser Verschiebung wäre eine verminderte synaptische Reizweiterleitung, also eine Desensibilisierung der DRG-Neurone. Dieser beobachtete Effekt bestätigt den Befund einer verminderten Neurotransmitter-Freisetzung durch NPY (Bleakman et al., 1991). Dementgegen steht jedoch die eigene Beobachtung einer erhöhten Sekretion von LDCVs. Man könnte allerdings schließen, dass es sich bei diesen Exozytoseereignissen nicht um die von Zhang und Zhou (2002) beschriebene spannungsabhängige Form der Exozytose handelt, da sonst bei einer Veränderung des Ruhemembranpotentials und einer damit einhergehenden Desensibilisierung, jedoch einer gleichbleibenden Stärke der Stimulation nicht mehr, sondern weniger LDCVs freigesetzt würden. Zur Überprüfung, ob NPY tatsächlich eine Veränderung des Ruhemembranpotentials bewirkt, wurden Current-Clamp-Experimente durchgeführt. Allerdings muss an dieser Stelle gesagt werden, dass diese leider nicht auswertbar waren. Da Messungen mit NPY sehr lange ( $\geq 10$  min) dauern, ist es in elektrophysiologischen Experimenten oft schwierig, Zellen bei gleichbleibender Qualität, sprich einem niedrigen Serienwiderstand, einem hohen Abdichtungswiderstand und mit geringen Leckströmen, über die ganze Dauer des Experimentes zu messen. Da bei elektrophysiologischen Messungen Zellen und deren Membran stark beansprucht werden, reagieren viele Zellen darauf mit einer Veränderung ihrer Eigenschaften und schließlich mit der Einleitung der Apoptose. In den durchgeführten Current-Clamp-Experimenten war diese Reaktion der Zellen leider so häufig der Fall, dass zu wenige Zellen für eine Analyse zur Verfügung standen, um aus ihnen fundierte Schlussfolgerungen ziehen zu können.

Es wurde gezeigt, dass der Neuromodulator NPY, der nach Nervenschädigungen in DRG-Neuronen stark hochreguliert wird, neben dem bereits bekannten Effekt auf die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat, auch eine autoregulatorische Funktion bei seiner eigenen Freisetzung, sprich der Exozytose von LDCVs, besitzt. In der pathophysiologischen Situation einer Nervenschädigung und somit im Auftreten einer schmerzhaften Empfindung führt die Freisetzung von NPY, alles in allem, zu einer vermehrten Ausschüttung weiterer Mengen neuromodulatorischer Substanzen.

#### 4.4. NPY aktiviert Proteinkinase A in DRG-Neuronen

Wie bereits erwähnt, kann NPY, bzw. dessen Bindung an einen seiner Rezeptoren, einen Effekt auf verschiedene Proteine in einer Zelle haben. Von Endoh et al. (2012) wurde beschrieben, dass NPY in Neuronen des submandibularen Ganglions zu einer verstärkten Aktivierung von L-Typ VDCCs über die Aktivierung der AC und der PKA führt. Da in der vorliegenden Dissertation gezeigt wurde, dass NPY in DRG-Neuronen zu einer erhöhten, möglicherweise calciumabhängigen und spannungsunabhängigen, Exozytose von LDCVs führt, wurde überprüft, ob dieser Effekt ebenfalls über die Aktivierung der PKA vermittelt wird. Mögliche Zielproteine der PKA in DRG-Neuronen, die eine Erhöhung der LDCV-Sekretion bewirken könnten, sind Proteine, die an der regulierten Exozytose von Vesikeln beteiligt sind, wie beispielsweise SNAP25, Snapin oder Tomosyn (Baba et al., 2005; Nagy et al., 2004; Thakur et al., 2004). Auch eine Translokation gepimter LDCVs in die Nähe von Calciumkanälen durch PKA ist denkbar (Kits und Mansvelder, 2000).

Es zeigte sich, dass durch NPY in DRG-Neuronen tatsächlich eine Aktivierung der PKA stattfindet (Abbildung 25) und dass diese für die erhöhte LDCV-Sekretion verantwortlich ist. Blockiert man die PKA durch Zugabe ihres Inhibitors H-89, so ist die durch NPY induzierte vermehrte Freisetzung von LDCVs nicht mehr zu beobachten (Abbildung 26). Ein interessanter Effekt bei den Untersuchungen zur PKA-Aktivierung war, dass bei einer Inhibierung der PKA und gleichzeitiger Aktivierung der AC, CREB, dessen Phosphorylierung als Indikator für eine Aktivierung der AC und der PKA diene, im Vergleich zu einer alleinigen Aktivierung der AC, übermäßig stark phosphoryliert wurde. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass durch eine Blockade der PKA möglicherweise andere Signalwege, wie beispielsweise die Aktivierung von ERK (extracellular-signal regulated kinase) (Kawasaki et al., 2004), die durch die AC angesprochen werden, überkompensatorisch aktiviert werden.

Es konnte also gezeigt werden, dass NPY in DRG-Neuronen unter anderem zu einer Aktivierung der Proteinkinase A führt und dass diese in die durch NPY erhöhte Sekretion von LDCVs involviert ist. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, welches die Zielproteine der Phosphorylierung durch PKA in DRG-Neuronen sind, die diese Erhöhung der Sekretionsrate der LDCVs vermitteln. Denkbar wären hier Proteine, die an der Exozytose von Vesikeln beteiligt sind, wie SNAP-25, Snapin oder Tomosyn.

#### 4.5. Relevanz der Arbeit und Ausblick

Bisher ist über den Mechanismus der Exozytose von LDCVs in Neuronen, trotz der wichtigen neuromodulatorischen Funktion, den der Inhalt der LDCVs besitzt, wenig bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern neue Erkenntnisse darüber, wie Exozytose von LDCVs in DRG-Neuronen induziert wird und welche Rolle dem Inhalt der LDCVs, neben der Modulation der Reizweiterleitung, zukommt.

Es konnte gezeigt werden, dass DRG-Neurone bei einer Stimulationsfrequenz von 5 Hz, wie sie *in vivo* nur in gesunden DRG-Neuronen vorkommt, nur sehr wenige LDCVs freisetzen. In einer pathophysiologischen Situation, wie sie *in vivo* bei der Verletzung von Nerven auftritt, in der die Frequenz der Stimulation 100 Hz erreichen kann, ist hingegen die Rate sezernierter LDCVs stark erhöht. DRG-Neurone setzen bei einer Frequenz der Stimulation von 100 Hz in den meisten Fällen den gesamten Inhalt ihrer LDCVs durch die Nutzung der „Full Fusion“-Exozytose frei. Weiter wurde nachgewiesen, dass dem Inhalt der LDCVs neben seiner Rolle bei der Modulation der Reizweiterleitung, wie in vielen Publikationen bereits gezeigt, auch eine Funktion bei der Freisetzung der LDCVs selbst zukommt. So bewirkt die Freisetzung von NPY, welches nur nach Verletzungen von Nerven stark exprimiert wird, aus LDCVs peptiderger DRG-Neurone, die vermehrte Freisetzung weiterer Neuromodulatoren durch eine erhöhte Rate der LDCV-Sekretion, eine vermehrte Nutzung des „Full Fusion“-Modus und eine verlängerte Öffnungsdauer der Fusionspore bei dem Fusionstyp „Kiss and Stay“. Diese Beobachtungen zeigen, dass NPY *in vivo* nach einer Nervenschädigung möglicherweise seine eigene und die Freisetzung anderer Neuromodulatoren auto- oder auch parakrin über einen positiven Feedback-Mechanismus fördert und so die Empfindung von Schmerz lindern kann. Vermittelt wird der Effekt von NPY über die Aktivierung der Proteinkinase A.

Gegenstand weiterer Untersuchungen über die Exozytose von LDCVs aus DRG-Neuronen könnte, unter anderem, die Aufklärung des genauen molekularen Mechanismus der LDCV-Sekretion sein, dessen Verständnis für die Behandlung krankhafter, schmerzhafter Wahrnehmungen mögliche neue Ziele bieten könnte. Auch die Wirkung der vielen anderen, in DRG-Neuronen vorkommenden Neuromodulatoren auf die LDCV-Freisetzung könnte interessante Erkenntnisse liefern. Da in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte, welche Proteine durch die Aktivierung der PKA in DRG-Neuronen beeinflusst werden, um die Sekretion von Neuromodulatoren aus LDCVs zu fördern, könnte die Beantwortung dieser



offenen Frage ebenfalls Grundlage für weiterführende Untersuchungen sein. Weiterhin könnte durch die Nutzung spezifischer Agonisten und Antagonisten aufgeklärt werden, welcher der NPY-Rezeptoren die in dieser Arbeit beobachteten Effekte vermittelt.

## Literaturverzeichnis

- Abdulla FA, Smith PA (1999) Nerve injury increases an excitatory action of neuropeptide Y and Y2-agonists on dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 89:43-60.
- Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, Ghatei MA, Rossor MN, Roberts GW, Crow TJ, Tatemoto K, Polak JM (1983) Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 306:584-586.
- Aicher SA, Springston M, Berger SB, Reis DJ, Wahlestedt C (1991) Receptor-selective analogs demonstrate NPY/PYY receptor heterogeneity in rat brain. *Neuroscience letters* 130:32-36.
- Albers HE, Ferris CF (1984) Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neuroscience letters* 50:163-168.
- Ales E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M, Alvarez de Toledo G (1999) High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nature cell biology* 1:40-44.
- Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM (1983) Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221:877-879.
- An S, Zenisek D (2004) Regulation of exocytosis in neurons and neuroendocrine cells. *Current opinion in neurobiology* 14:522-530.
- Aoki R, Kitaguchi T, Oya M, Yanagihara Y, Sato M, Miyawaki A, Tsuboi T (2010) Duration of fusion pore opening and the amount of hormone released are regulated by myosin II during kiss-and-run exocytosis. *The Biochemical journal* 429:497-504.
- Axelrod D (1981) Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of cell biology* 89:141-145.
- Axelrod D (2001) Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* 2:764-774.
- Baba T, Sakisaka T, Mochida S, Takai Y (2005) PKA-catalyzed phosphorylation of tomosyn and its implication in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of neurotransmitter. *The Journal of cell biology* 170:1113-1125.
- Becherer U, Rettig J (2006) Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell and tissue research* 326:393-407.
- Becherer U, Pasche M, Nofal S, Hof D, Matti U, Rettig J (2007) Quantifying exocytosis by combination of membrane capacitance measurements and total internal reflection fluorescence microscopy in chromaffin cells. *PLoS one* 2:e505.
- Bleakman D, Colmers WF, Fournier A, Miller RJ (1991) Neuropeptide Y inhibits Ca<sup>2+</sup> influx into cultured dorsal root ganglion neurones of the rat via a Y2 receptor. *British journal of pharmacology* 103:1781-1789.

- Brothers SP, Saldanha SA, Spicer TP, Cameron M, Mercer BA, Chase P, McDonald P, Wahlestedt C, Hodder PS (2010) Selective and brain penetrant neuropeptide y y2 receptor antagonists discovered by whole-cell high-throughput screening. *Molecular pharmacology* 77:46-57.
- Brumovsky P, Stanic D, Shuster S, Herzog H, Villar M, Hokfelt T (2005) Neuropeptide Y2 receptor protein is present in peptidergic and nonpeptidergic primary sensory neurons of the mouse. *J Comp Neurol* 489:328-348.
- Brumovsky PR, Shi TJ, Matsuda H, Kopp J, Villar MJ, Hokfelt T (2002) NPY Y1 receptors are present in axonal processes of DRG neurons. *Experimental neurology* 174:1-10.
- Bruns D (2004) Detection of transmitter release with carbon fiber electrodes. *Methods* 33:312-321.
- Buchsacher GL, Jr., Wong-Staal F (2000) Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95:2499-2504.
- Cens T, Rousset M, Leyris JP, Fesquet P, Charnet P (2006) Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca(2+) channels. *Progress in biophysics and molecular biology* 90:104-117.
- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1984) Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115:427-429.
- Colmers WF, Lukowiak K, Pittman QJ (1988) Neuropeptide Y action in the rat hippocampal slice: site and mechanism of presynaptic inhibition. *J Neurosci* 8:3827-3837.
- de Wit J, Toonen RF, Verhage M (2009) Matrix-dependent local retention of secretory vesicle cargo in cortical neurons. *J Neurosci* 29:23-37.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology* 72:8463-8471.
- Elhamdani A, Palfrey HC, Artalejo CR (2001) Quantal size is dependent on stimulation frequency and calcium entry in calf chromaffin cells. *Neuron* 31:819-830.
- Endoh T, Nobushima H, Tazaki M (2012) Neuropeptide Y modulates calcium channels in hamster submandibular ganglion neurons. *Neuroscience research* 73:275-281.
- Fjell J, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Fried K, Black JA, Waxman SG (1999) Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons. *Brain research Molecular brain research* 67:267-282.
- Fulop T, Radabaugh S, Smith C (2005) Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 25:7324-7332.
- Gasser HS, Grundfest H (1939) Axon diameters in relation to the spike dimensions and the conduction velocity in mammalian fibers. *American Journal of Physiology* 127:393-414.

- Ghijssen WE, Leenders AG (2005) Differential signaling in presynaptic neurotransmitter release. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 62:937-954.
- Gibbins IL, Furness JB, Costa M (1987) Pathway-specific patterns of the co-existence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystokinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglia of the guinea-pig. *Cell and tissue research* 248:417-437.
- Hiruma H, Saito A, Kusakabe T, Takenaka T, Kawakami T (2002) Neuropeptide Y inhibits axonal transport of particles in neurites of cultured adult mouse dorsal root ganglion cells. *The Journal of Physiology* 543:85-97.
- Hokfelt T (1991) Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron* 7:867-879.
- Hokfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, Schultzberg M (1980) Peptidergic neurones. *Nature* 284:515-521.
- Hokfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergeev V, Ubink R, Diez M (2000) Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology* 39:1337-1356.
- Hua XY, Boublik JH, Spicer MA, Rivier JE, Brown MR, Yaksh TL (1991) The antinociceptive effects of spinally administered neuropeptide Y in the rat: systematic studies on structure-activity relationship. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 258:243-248.
- Huang LY, Neher E (1996) Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron* 17:135-145.
- Hugo S, Dembla E, Halimani M, Matti U, Rettig J, Becherer U (2013) Deciphering dead-end docking of large dense core vesicles in bovine chromaffin cells. *J Neurosci* 33:17123-17137.
- Ikeda K, Bekkers JM (2009) Counting the number of releasable synaptic vesicles in a presynaptic terminal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:2945-2950.
- Intondi AB, Dahlgren MN, Eilers MA, Taylor BK (2008) Intrathecal neuropeptide Y reduces behavioral and molecular markers of inflammatory or neuropathic pain. *Pain* 137:352-365.
- Kalra SP, Crowley WR (1984) Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life sciences* 35:1173-1176.
- Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang ZY, Brenner GJ, Wang H, Van Der Meer C, Befort K, Woolf CJ, Ji RR (2004) Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci* 24:8310-8321.

- Kits KS, Mansvelder HD (2000) Regulation of exocytosis in neuroendocrine cells: spatial organization of channels and vesicles, stimulus-secretion coupling, calcium buffers and modulation. *Brain research Brain research reviews* 33:78-94.
- Klingauf J, Neher E (1997) Modeling buffered  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophysical journal* 72:674-690.
- Lallemend F, Ernfors P (2012) Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends in neurosciences* 35:373-381.
- Landry M, Vila-Porcile E, Hokfelt T, Calas A (2003) Differential routing of coexisting neuropeptides in vasopressin neurons. *The European journal of neuroscience* 17:579-589.
- Landry M, Liu HX, Shi TJ, Brumovsky P, Nagy F, Hokfelt T (2005) Galaninergic mechanisms at the spinal level: focus on histochemical phenotyping. *Neuropeptides* 39:223-231.
- Leffler A, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Hormuzdiar WN, Black JA, Waxman SG (2002) GDNF and NGF reverse changes in repriming of TTX-sensitive  $\text{Na}^{+}$  currents following axotomy of dorsal root ganglion neurons. *Journal of neurophysiology* 88:650-658.
- Levine AS, Morley JE (1984) Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides* 5:1025-1029.
- Lewis PF, Emerman M (1994) Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of virology* 68:510-516.
- Lowell BB (2007) Generation of transgenic reporter mice with umanized Renilla GFP under control of the NPY promoter. MGI Direct Data Submission MGI: J:120993
- Martin TF (2003) Tuning exocytosis for speed: fast and slow modes. *Biochimica et biophysica acta* 1641:157-165.
- Matsuda N, Lu H, Fukata Y, Noritake J, Gao H, Mukherjee S, Nemoto T, Fukata M, Poo MM (2009) Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J Neurosci* 29:14185-14198.
- Merighi A (2002) Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Progress in neurobiology* 66:161-190.
- Merighi A, Salio C, Ferrini F, Lossi L (2011) Neuromodulatory function of neuropeptides in the normal CNS. *Journal of chemical neuroanatomy* 42:276-287.
- Merighi A, Polak JM, Gibson SJ, Gulbenkian S, Valentino KL, Peirone SM (1988) Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinins- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. *Cell and tissue research* 254:101-109.

- Michaelis M, Liu X, Janig W (2000) Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion. *J Neurosci* 20:2742-2748.
- Miklavc P, Wittekindt OH, Felder E, Dietl P (2009) Ca<sup>2+</sup>-dependent actin coating of lamellar bodies after exocytotic fusion: a prerequisite for content release or kiss-and-run. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1152:43-52.
- Moran TD, Colmers WF, Smith PA (2004) Opioid-like actions of neuropeptide Y in rat substantia gelatinosa: Y1 suppression of inhibition and Y2 suppression of excitation. *Journal of neurophysiology* 92:3266-3275.
- Nagy G, Reim K, Matti U, Brose N, Binz T, Rettig J, Neher E, Sorensen JB (2004) Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* 41:417-429.
- Naldini L (1999) In vivo gene delivery by lentiviral vectors. *Thrombosis and haemostasis* 82:552-554.
- Neher E (1998) Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20:389-399.
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Neher E, Zucker RS (1993) Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10:21-30.
- Neher E, Sakaba T (2008) Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59:861-872.
- Palfrey HC, Artalejo CR (2003) Secretion: kiss and run caught on film. *Current biology : CB* 13:R397-399.
- Pasche M, Matti U, Hof D, Rettig J, Becherer U (2012) Docking of LDCVs is modulated by lower intracellular [Ca<sup>2+</sup>] than priming. *PLoS one* 7:e36416.
- Rettig J, Neher E (2002) Emerging roles of presynaptic proteins in Ca<sup>++</sup>-triggered exocytosis. *Science* 298:781-785.
- Rizzoli SO, Jahn R (2007) Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. *Traffic* 8:1137-1144.
- Ryu PD, Murase K, Gerber G, Randic M (1988) Actions of calcitonin gene-related peptide on rat sensory ganglion neurones. *Physiologia Bohemoslovaca* 37:259-265.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.

- Salio C, Averill S, Priestley JV, Merighi A (2007) Costorage of BDNF and neuropeptides within individual dense-core vesicles in central and peripheral neurons. *Developmental neurobiology* 67:326-338.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5467.
- Schneggenburger R, Sakaba T, Neher E (2002) Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends in neurosciences* 25:206-212.
- Schoenen J, Delree P, Leprince P, Moonen G (1989) Neurotransmitter phenotype plasticity in cultured dissociated adult rat dorsal root ganglia: an immunocytochemical study. *Journal of neuroscience research* 22:473-487.
- Shi TJ, Zhang X, Berge OG, Erickson JC, Palmiter RD, Hokfelt T (1998) Effect of peripheral axotomy on dorsal root ganglion neuron phenotype and autonomy behaviour in neuropeptide Y-deficient mice. *Regulatory peptides* 75-76:161-173.
- Shinoda Y, Sadakata T, Nakao K, Katoh-Semba R, Kinameri E, Furuya A, Yanagawa Y, Hirase H, Furuichi T (2011) Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:373-378.
- Smith PA, Moran TD, Abdulla F, Tumber KK, Taylor BK (2007) Spinal mechanisms of NPY analgesia. *Peptides* 28:464-474.
- Sobota JA, Mohler WA, Cowan AE, Eipper BA, Mains RE (2010) Dynamics of peptidergic secretory granule transport are regulated by neuronal stimulation. *BMC neuroscience* 11:32.
- Sorensen JB (2004) Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 448:347-362.
- Spruce AE, Breckenridge LJ, Lee AK, Almers W (1990) Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle. *Neuron* 4:643-654.
- Stanley BG, Leibowitz SF (1984) Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life sciences* 35:2635-2642.
- Steyer JA, Almers W (2001) A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nature reviews Molecular cell biology* 2:268-275.
- Taiwo OB, Taylor BK (2002) Antihyperalgesic effects of intrathecal neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y1 receptors. *Pain* 96:353-363.
- Tatemoto K (1982) Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:5485-5489.

- Tatemoto K (2004) Neuropeptide Y: History and Overview. *Handbook of Experimental Pharmacology* 162:1-21.
- Thakur P, Stevens DR, Sheng ZH, Rettig J (2004) Effects of PKA-mediated phosphorylation of Snapin on synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:6476-6481.
- Toth PT, Bindokas VP, Bleakman D, Colmers WF, Miller RJ (1993) Mechanism of presynaptic inhibition by neuropeptide Y at sympathetic nerve terminals. *Nature* 364:635-639.
- Voets T (2000) Dissection of three  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28:537-545.
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:615-619.
- Walker MW, Ewald DA, Perney TM, Miller RJ (1988) Neuropeptide Y modulates neurotransmitter release and  $\text{Ca}^{2+}$  currents in rat sensory neurons. *J Neurosci* 8:2438-2446.
- Wall PD, Devor M (1983) Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain* 17:321-339.
- Wiley RG, Lemons LL, Kline RH (2009) Neuropeptide Y receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nocifensive reflex responses to heat and formalin. *Neuroscience* 161:139-147.
- Xia X, Lessmann V, Martin TF (2009) Imaging of evoked dense-core-vesicle exocytosis in hippocampal neurons reveals long latencies and kiss-and-run fusion events. *Journal of cell science* 122:75-82.
- Yee JK, Moores JC, Jolly DJ, Wolff JA, Respass JG, Friedmann T (1987) Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:5197-5201.
- Yu SF, von Ruden T, Kantoff PW, Garber C, Seiberg M, Ruther U, Anderson WF, Wagner EF, Gilboa E (1986) Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:3194-3198.
- Yuan W, Bers DM (1995) Protein kinase inhibitor H-89 reverses forskolin stimulation of cardiac L-type calcium current. *The American journal of physiology* 268:C651-659.
- Zhang C, Zhou Z (2002)  $\text{Ca}^{2+}$ -independent but voltage-dependent secretion in mammalian dorsal root ganglion neurons. *Nature neuroscience* 5:425-430.
- Zhang X, Aman K, Hokfelt T (1995a) Secretory pathways of neuropeptides in rat lumbar dorsal root ganglion neurons and effects of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 352:481-500.



- Zhang X, Bao L, Ma GQ (2010) Sorting of neuropeptides and neuropeptide receptors into secretory pathways. *Progress in neurobiology* 90:276-283.
- Zhang X, Xu ZQ, Bao L, Dagerlind A, Hokfelt T (1995b) Complementary distribution of receptors for neurotensin and NPY in small neurons in rat lumbar DRGs and regulation of the receptors and peptides after peripheral axotomy. *J Neurosci* 15:2733-2747.
- Zhang X, Bao L, Xu ZQ, Kopp J, Arvidsson U, Elde R, Hokfelt T (1994) Localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat nervous system with special reference to somatic receptors on small dorsal root ganglion neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:11738-11742.
- Zheng H, Fan J, Xiong W, Zhang C, Wang XB, Liu T, Liu HJ, Sun L, Wang YS, Zheng LH, Wang BR, Zhang CX, Zhou Z (2009) Action potential modulates Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent secretion in a sensory neuron. *Biophysical journal* 96:2449-2456.
- Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology* 72:9873-9880.

## Publikationen & Konferenzbeiträge

### Eigene Publikationen

**Bost A**, Pasche M, Schirra C, Becherer U (2013). Super-resolution microscopy in studying neuroendocrine cell function. *Frontiers in neuroscience* 7:222.

Dhara M, Yarzagaray A, Schwarz Y, Dutta S, Grabner C, Moghadam PK, **Bost A**, Schirra C, Rettig J, Reim K, Brose N, Mohrmann R, Bruns D (2014). Complexin synchronizes primed vesicle exocytosis and regulates fusion pore dynamics. *The Journal of cell biology* 204:1123-1140.

**Bost A**, Schwarz Y, Krause E, Niemeyer BA, Becherer U (submitted to *The Journal of Neuroscience*, July 2014). Large dense core vesicle release in mouse dorsal root ganglion neurons can be regulated by neuropeptide Y.

### Konferenzbeiträge/Posterpräsentationen

**Bost A**, Matti U, Niemeyer BA, Becherer U (2011). "LDCV release from DRG neurons and possible modulations". SFB894/GK1326/MCBO Joint Meeting 2011, Homburg/Saar, Deutschland.

**Bost A**, Niemeyer BA, Becherer U (2012). "LDCV release from DRG neurons and its modulation by NPY". SFB 894 Meeting 2012, Homburg/Saar, Deutschland.

Schirra C, Pattu V, Matti U, Edelmann L, **Bost A**, Dudenhöffer-Pfeiffer M, Weins L, Rettig J (2012). "Correlated fluorescence and electron microscopy in cytotoxic T lymphocytes of a Synaptobrevin2-mRFP knockin-mouse". Conference on In-situ and Correlative Electron Microscopy (CISCeM), Saarbrücken, Deutschland.

**Bost A**, Niemeyer BA, Rettig J, Becherer U (2013). "LDCV release from DRG neurons and its modulation by NPY". 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Deutschland.

**Bost A**, Niemeyer BA, Rettig J, Becherer U (2013). "LDCV release from DRG neurons and its modulation by NPY". 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, Kalifornien, USA.

## Danksagungen

Der wichtigste Dank gilt wohl Prof. Dr. Jens Rettig und PD Dr. Ute Becherer, die mir die Möglichkeit gegeben haben, dieses Thema zu bearbeiten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Außerdem bin ich in der glücklichen Lage, viele liebe Menschen zu kennen und kennengelernt zu haben, die mich, nach ihren Möglichkeiten, immer unterstützt, abgelenkt oder aufgebaut haben, je nachdem, was gerade nötig war. Bitte nehmt es mir nicht übel, wenn ich jemanden vergesse zu erwähnen. Den Menschen, denen ich aus tiefstem Herzen danke, habe ich dies hoffentlich ab und an gezeigt oder gesagt und sie wissen daher, auch ohne große Worte an dieser Stelle, um meine Dankbarkeit. Nichtsdestotrotz möchte ich diese Menschen hier erwähnen und hoffe, jeder, der es aus meiner Sicht verdient hat, findet sich wieder:

M.B. Dr. B.F. K.B.B.  
F.S.  
O.R.  
B.S. Dr. T.N.S.  
C.D. Dr. U.H.  
Dr. S.H.  
A.W.  
Dr. E.K. Dr. M.M.  
L.W. Dr. D.S.  
A.L. Dr. M.H. Dr. P.W.  
I.K. M.K.  
G.B.

**DANKE!!!**